

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Der Surfactant-Lipidtransporter ABCA3 wird in LAMP3-positiven
Vesikeln N-terminal proteolytisch gespalten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefanie Gschwendtner, geb. Engelbrecht
aus

Marktl

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Gries
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Behr Prof. Dr. Christian Sommerhoff
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. Sunčana Kern
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	13.12.2018

Für Mama

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	8
2	Einleitung.....	9
2.1	Surfactant.....	9
2.1.1	Zusammensetzung und Funktion.....	9
2.1.2	Biosynthese und Regulation.....	11
2.2	Atemnotsyndrom.....	14
2.3	ILD.....	16
2.4	ABCA3	19
2.4.1	ABC-Familie	19
2.4.2	ABCA3: Gen und Protein.....	21
2.4.3	Funktion von ABCA3	22
2.4.4	Prozessierung von ABCA3	23
2.4.5	ABCA3 Mutationen	25
2.4.5.1	Einteilung.....	25
2.4.5.2	Q215K.....	25
2.4.5.3	E292V	26
2.5	Zielsetzung.....	27
3	Material und Methoden.....	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	Laborinstrumente.....	28
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	29
3.1.4	Puffer und Lösungen	30
3.1.5	Kits	33
3.1.6	Enzyme.....	33
3.1.7	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	33
3.1.8	Antikörper	34
3.1.9	Längen- und Größenstandards.....	34
3.1.10	Primer	34
3.1.11	Zelllinien	34
3.1.12	Vektoren	35
3.2	Methoden	35
3.2.1	Klonierung des GFP ^N -ABCA3-WT-Vektors	35
3.2.1.1	Vorarbeiten	35
3.2.1.1.1	Transformation von Plasmid-DNA in E.coli Zellen	35

3.2.1.1.2	E.coli Zellkultur und Plasmidisolierung.....	35
3.2.1.1.3	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	36
3.2.1.2	DNA- Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.2.1.3	Größenbestimmung des PCR-Produkts mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	39
3.2.1.4	Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkt	39
3.2.1.5	Aufreinigung von PCR-Produkt und Vektor mittels Crystal Violet Agarosegel-Elektrophorese	40
3.2.1.6	Dephosphorylierung des Vektors.....	41
3.2.1.7	Ligation von PCR-Produkt und Vektor	41
3.2.1.8	Identifikation und Isolierung fehlerfrei klonierter Plasmide.....	41
3.2.2	Zellkulturmethoden	42
3.2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	42
3.2.2.2	Auftauen von Zellen	42
3.2.2.3	Passagieren von adhärent wachsenden Zellen	42
3.2.2.4	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	42
3.2.2.5	Einfrieren von Zellen	43
3.2.2.6	Transiente Transfektion von A549-Zellen.....	43
3.2.2.7	Behandlung stabil transfizierter A549 Zellen mit Antibiotika und Proteaseinhibitoren...	44
3.2.2.8	Herstellung von Zell-Lysaten	44
3.2.2.9	Membranisolierung.....	45
3.2.3	Quantitative Proteinbestimmung	45
3.2.4	Proteindeglykosylierung.....	46
3.2.5	Immunologische Methoden.....	46
3.2.5.1	Western Blot	46
3.2.5.2	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	48
3.2.6	Statistische Methoden.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	WT-Prozessierung von ABCA3.....	50
4.1.1	Die 150kDa große Form von WT-ABCA3 wird in stabil transfizierten A549-Zellen stärker exprimiert als in transient transfizierten Zellen.....	50
4.1.2	Der neu erstellte GFP ^N -ABCA3-WT-Vektor kann zur Transfektion von A549 Zellen verwendet werden.....	51
4.1.3	Der N-Terminus ist bei der 150/180kDa großen Form von WT-ABCA3 abgespalten.....	53
4.1.4	Die vollständige Deglykosylierung von WT ABCA3 führt zu einer Reduktion der Proteingröße um 10kDa.....	54
4.1.5	Die proteolytische Spaltung von ABCA3 erfolgt innerhalb der Lamellarkörperchen	55

4.1.6	Der N-terminale Marker von WT-ABCA3 kann in LAMP3 positiven Vesikeln nachgewiesen werden.....	59
4.1.7	Cysteinproteasen sind an der Prozessierung von ABCA3 beteiligt.....	61
4.2	Prozessierung im Fall von ABCA3-Mutationen.....	64
4.2.1	E292V.....	64
4.2.1.1	E292V ist in LBs nachweisbar.....	64
4.2.1.2	E292V wird wie WT-ABCA3 N-terminal proteolytisch gespalten	65
4.2.1.3	Die N-terminale Spaltung von E292V erfolgt ebenfalls durch Cysteinproteasen	68
4.2.2	Q215K	69
4.2.2.1	Q215K ist im ER nicht jedoch in LBs nachweisbar	69
4.2.2.2	Bei Q215K unterbleibt die N-terminale proteolytische Spaltung.....	70
5	Diskussion.....	72
5.1	Prozessierung von WT ABCA3.....	72
5.1.1	ABCA3 wird N-terminal proteolytisch gespalten	72
5.1.2	Identifizierung von LAMP3 positiven Vesikeln als Ort der proteolytischen Spaltung.....	74
5.1.3	Cysteinproteasen als verantwortliche Enzyme der proteolytischen Spaltung	77
5.2	N-Terminus als mögliches Signalpeptid	78
5.3	Funktion der 180/150kDa großen Form von ABCA3.....	79
5.4	Chaperone als mögliche Therapieoption.....	82
6	Literaturverzeichnis	85
7	Anhang.....	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	91
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	93
7.3	Tabellenverzeichnis	95
7.4	Lebenslauf.....	96
7.5	Publikationsliste.....	98
8	Danksagung.....	99

1 Zusammenfassung

Der *ATP-binding cassette transporter A3* (ABCA3) ist ein Phospholipidtransporter, welcher in den Typ II Pneumozyten der Lunge exprimiert wird und an der Ausbildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms beteiligt ist. Mutationen im ABCA3-Gen können sowohl zur Entstehung des neonatalen Atemnotsyndroms, als auch zur Entwicklung einer interstitiellen Lungenerkrankung führen.

Das ABCA3-WT-Protein wird im Endoplasmatischem Reticulum gefaltet und anschließend im Golgi-Apparat glykosyliert, bevor es seinen Wirkort, die Lamellarkörperchen (LBs), über deren Zwischenstufe, die Multivesikularkörperchen (MVBs), erreicht. Über die weiteren Schritte der WT-Prozessierung von ABCA3 war bisher wenig bekannt.

Da C-terminal mit HA markiertes WT-ABCA3 im Western Blot in Form von zwei Banden mit einer Größe von 190kDa bzw. 150kDa zur Darstellung kommt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die kleinere Form von ABCA3 im Lauf der Prozessierung aus der größeren Form hervorgeht. Mithilfe eines zuvor durch Klonierung erstellten N-terminal markierten WT-ABCA3-Vektors (GFP^N-ABCA3-WT-Vektor) konnte in Western Blots gezeigt werden, dass der 150kDa-Form von WT-ABCA3 der N-Terminus fehlt. In weiteren Versuchen konnte mittels schrittweiser Unterbrechung der WT-Protein-Prozessierung durch unterschiedliche Antibiotika und anschließend erneuter Auswertung der Ergebnisse mittels Western Blot dargelegt werden, dass die proteolytische Prozessierung innerhalb der LBs abläuft. Diese Ergebnisse konnten durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Als verantwortliche Enzyme hierfür wurden Cysteinproteasen ermittelt.

Da einige ABCA3-Mutationen zu einer gestörten Proteinprozessierung führen, können die gewonnenen Daten und das somit bessere Verständnis der WT-Prozessierung in Zukunft möglicherweise genutzt werden, um neue Therapieansätze zur Behandlung der genetischen Form des neonatalen Atemnotsyndroms und der ILD zu entwickeln.

2 Einleitung

2.1 Surfactant

2.1.1 Zusammensetzung und Funktion

Als Surfactant bezeichnet man ein Gemisch aus Phospholipiden und Proteinen, welches eine essentielle Bedeutung für den ungestörten Ablauf der Atmung hat [59]. Der Surfactantfilm kleidet die Alveolen aus. Hierbei handelt es sich um die kleinsten Bausteine der Lunge, die über ihre Membranen den Gasaustausch zwischen Umwelt und Blut erst ermöglichen. Die Membran der Alveolen besteht aus den sogenannten Typ I und Typ II Pneumozyten (Abbildung 1). Während die Typ I Pneumozyten den größten Anteil an der Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt haben, so besteht die Funktion der Typ II Pneumozyten zum einen in der Rolle als Vorläuferzellen der Typ I Pneumozyten und zum anderen in der Synthese eines funktionstüchtigen Surfactantfilms [60]. Ohne diesen wäre ein Gasaustausch nicht möglich. Die Oberflächenspannung innerhalb der Alveolen würde unweigerlich zum endexpiratorischen Kollaps der Lungenbläschen führen. Diesem Kollaps wirkt der Surfactantfilm entgegen, indem er die Oberflächenspannung senkt und somit die Entstehung von Atelektasen am Ende der Expiration verhindert [59]. Da hierfür die besondere Zusammensetzung des Surfactantfilms verantwortlich ist, soll im Folgenden näher auf die einzelnen Bestandteile eingegangen werden.

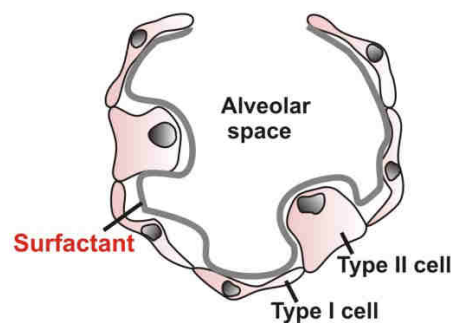


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Alveole

Dargestellt ist eine Alveole. Das Alveolarepithel wird von Typ I und Typ II Pneumozyten gebildet. Letztere sind für die Produktion des Surfactantfilms verantwortlich, welcher wiederum die Oberflächenspannung innerhalb der Alveolen stark reduziert. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kern)

Hauptbestandteil von Surfactant sind Lipide. Den größten Anteil machen hierbei mit mehr als 80% Phospholipide aus. Unter den Phospholipiden stellt wiederum Phosphatidylcholin den

Hauptbestandteil dar. Es liegt zum größten Teil in ungesättigter Form vor und ist somit hauptverantwortlich für die Senkung der Oberflächenspannung. Aber auch andere Phospholipide sind am Aufbau des Surfactantfilms beteiligt. Hierzu zählen unter anderem Phosphatidylglycerol sowie Phosphatidylethanolamin [59].

Der Surfactantfilm besteht jedoch nicht nur aus Lipiden. Auch Proteine, die sogenannten Surfactantproteine (SP), sind Bestandteil dieses Gemisches und machen ca. 10% der Gesamtmasse aus [59]. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die für den Surfactantfilm spezifischen Surfactantproteine A, B, C und D, welche allesamt von Typ II Pneumozyten gebildet werden. Diese sind nicht nur wichtig für die Struktur des Surfactantfilms, sondern spielen zudem eine entscheidende Rolle im Surfactantmetabolismus [60]. Des Weiteren tragen die Surfactantproteine dazu bei, dass der Surfactantfilm neben seiner Hauptaufgabe, der Verringerung der Oberflächenspannung, auch andere wichtige Funktionen innerhalb der Lunge übernimmt. Die einzelnen Surfactantproteine unterscheiden sich hierbei deutlich in ihrer Struktur und den jeweiligen Wirkweisen.

So handelt es sich bei den Surfactantproteinen A und D um hydrophile Proteine, von denen angenommen wird, dass sie beide zum angeborenen Immunsystem der Lunge zählen. Ein Grund für diese Vermutung ist die Tatsache, dass sowohl SP-A als auch SP-D in der Lage sind, unterschiedlichste Pathogene wie Viren und Bakterien zu erkennen. Des Weiteren können beide Proteine über spezielle Rezeptoren an Makrophagen gebunden werden, welche wiederum selbst Bestandteile des unspezifischen angeborenen Abwehrsystems sind [61]. Neben dieser immunologischen Funktion wird davon ausgegangen, dass SP-A zudem für den Aufbau einer funktionstüchtigen Surfactantstruktur [62], sowie für die Surfactanthomöostase [63] von Bedeutung ist. Für Letztere scheint auch das SP-D von Bedeutung zu sein [64].

Bei den Surfactantproteinen B und C handelt es sich im Gegensatz zu SP-A und SP-D um hydrophobe Moleküle. Auch im Fall von SP-C wird mittlerweile davon ausgegangen, dass es zum angeborenen Immunsystem der Lunge beiträgt [65]. Zudem haben sowohl SP-C als auch SP-B eine besondere Bedeutung für die Ausbildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms und somit für die Verringerung der Oberflächenspannung. So konnte gezeigt werden, dass beide Proteine am Einbau von weiteren Lipiden in den Surfactantfilm beteiligt sind [61] und zudem die Verteilung der Phospholipide innerhalb der Alveolen begünstigen [65]. Die besondere Bedeutung des SP-B für die ungestörte Surfactantfunktion wird des Weiteren daraus ersichtlich, dass Mutationen im Gen für SP-B zu schweren pulmonalen Krankheitsbildern wie dem Atemnotsyndrom (ANS) und der Interstitiellen Lungenerkrankung

(ILD) führen können [3,58] und SP-B für die Formation von Lamellar-Körperchen (LBs) essentiell ist [31]. Die LBs haben wiederum eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung eines intakten Surfactantfilms, was bei der näheren Betrachtung von Surfactantsynthese und Regulation besser verständlich wird [66].

2.1.2 Biosynthese und Regulation

Die einzelnen Bestandteile des Surfactantfilms erreichen die Oberfläche der Alveolen, und somit die Grenze zwischen Körper und Umwelt, durch die Exozytose von sog. Lamellarkörperchen ("Lamellarbodies" LB) aus den Typ II Pneumozyten. Bei den LBs handelt es sich um saure Vesikel (pH ~ 5,5), die aus dicht gepackten Doppelmembranen bestehen und die Surfactantlipide sowie die hydrophoben Surfactantproteine B und C enthalten [66]. Sie gehen über die Zwischenstufe der "composite bodies" (CBs) aus den "multivesicular bodies" (MVBs) hervor (Abbildung 2) [40]. Aufgrund des sauren pH-Wertes innerhalb der LBs und der Tatsache, dass sie zahlreiche lysosomale Enzyme und Proteine, wie das *lysosome-associated membrane glycoprotein 3* (LAMP3) enthalten, werden die LBs zu den von *lysosome-like organelles* gezählt [24]. Im Unterschied zu Lysosomen sind LBs jedoch auf die Speicherung von Lipiden und Proteinen spezialisiert und nicht auf deren Abbau [40]. So konnten Rooney et al. bereits 1992 zeigen, dass zwischen der Phospholipidzusammensetzung innerhalb der LBs und der des Surfactantfilms sehr große Gemeinsamkeiten bestehen, was einen Hinweis auf die Bedeutung der LBs für die Surfactantbiosynthese erbrachte [67].

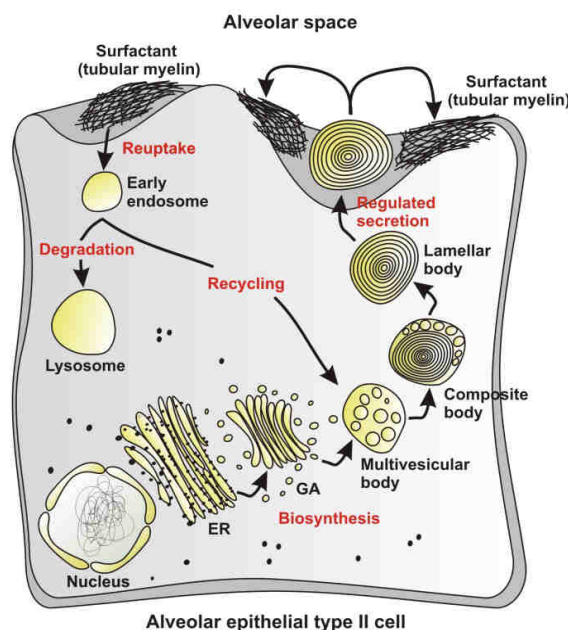


Abbildung 2: Biosynthese und Sekretion von Surfactantfilmbestandteilen

Gezeigt ist die schematische Darstellung eines Typ 2 Pneumozyten und die Entstehung, sowie Exozytose von LBs, welche wiederum die notwendigen Bestandteile für die Bildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms enthalten. ER= Endoplasmatisches Retikulum, GA= Golgi-Apparat (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S.Kern)

Heute weiß man, dass sowohl die im Surfactant enthaltenen Lipide, als auch die Surfactantproteine B und C zunächst das Endoplasmatische Retikulum (ER) passieren, um im Anschluss daran über den Golgi-Apparat (GA) die MVBs zu erreichen, aus denen, wie oben bereits erwähnt schließlich die LBs hervorgehen [68]. Für die Anordnung der Lipide innerhalb der LBs scheint SP-B von entscheidender Bedeutung zu sein. So unterbleibt bei Abwesenheit von SP-B die Bildung der dicht gepackten Phospholipiddoppelmembranen und es entstehen LBs, die viele kleine Vesikel beinhalten. Auch kommt es nach der Exozytose dieser fehlgebildeten LBs nicht zur Ausbildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms, was bei betroffenen Patienten meist zum Tod durch ANS kurz nach der Geburt führt [40].

Bevor SP-B allerdings den Einbau der Lipide in die Doppelmembranen der LBs unterstützen kann, müssen diese zunächst in die LBs gelangen. Der *ATP-binding cassette- transporter A3* (ABCA3) scheint hierbei eine unterstützende Funktion zu haben. ABCA3 wird vorwiegend in der Lunge exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass er hauptsächlich in der äußeren Membran von LBs lokalisiert ist [68, 69]. Mutationen des ABCA3-Gens können zur Ausbildung eines neonatalen ANS bzw. zur Entstehung einer ILD führen, was die Bedeutung von ABCA3 für die Bildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms unterstreicht [6]. Die

genaue Funktion von ABCA3 hierbei ist bis heute jedoch noch nicht abschließend erforscht. Allerdings konnte mittlerweile gezeigt werden, dass ABCA3 wie auch andere Transporter aus der ABC-Familie (z.B. ABCA1) [69], am Transport von Lipiden beteiligt ist und diese unter ATP-Verbrauch in die LBs transportiert [18, 19].

Neben dieser Funktion als Lipidtransporter, scheint ABCA3 zudem für die Ausbildung von MVBs bzw. LBs von Bedeutung zu sein [22]. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine ungestörte Funktion von ABCA3 für die Surfactantsynthese unbedingt notwendig ist. Auf die einzelnen Funktionen von ABCA3 wird jedoch später noch genauer eingegangen.

Im Anschluss an die Synthese der einzelnen Surfactantbestandteile und Speicherung dieser in den LBs folgt die Freisetzung des fertigen Surfactantgemisches in die Alveolen. Dies geschieht wie oben bereits erwähnt zum einen durch Exozytose der LBs (Abbildung 2), welche Lipide sowie die Surfactantproteine SP-B und C enthalten, und zum anderen durch die LB-unabhängige Freisetzung von SP-A und SP-D. Bisher sind drei Signalwege bekannt über welche die Exozytose der LBs gesteuert wird. Der erste Signalweg verläuft über die Aktivierung der Adenylatcyclase, welche schließlich ihrerseits zur Aktivierung der Proteinkinase A führt. Ein zweiter Signalweg beinhaltet die Funktion der aktivierten Proteinkinase C, während der dritte und letzte Signalweg eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration bewirkt. Allen drei Signalwegen ist gemein, dass sie letztendlich über eine Proteinphosphorylierung zum gewünschten Ergebnis, der Exozytose der LBs, führen. Die einzelnen Schritte, die nach der Phosphorylierung der Proteine ablaufen, sind bisher kaum erforscht [66].

Die Signalwege können durch unterschiedliche Reize in Gang gesetzt werden. So konnte die LB-Exozytose in vitro durch zahlreiche Rezeptoragonisten wie Adenosin oder ATP ausgelöst werden. Aber auch rezeptorunabhängige Stimuli wie die Dehnung von Typ II Pneumozyten führte zum gewünschten Ergebnis [40]. Über die physiologische Regulation der Surfactantfreisetzung aus Typ II ist allerdings nur wenig bekannt. Bisher konnten lediglich zwei physiologische Stimuli identifiziert werden. Hierzu zählt zum einen die Atmung selbst, welche vermutlich über die Dehnung der Pneumozyten zur LB-Sekretion führt. Zum anderen die Wehentätigkeit, welche eine vermehrte Surfactantfreisetzung beim Säugling zur Folge hat [66].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Bildung, Freisetzung und intraalveoläre Anordnung der einzelnen Surfactantbestandteile ein komplexer Prozess ist, welcher an vielen

unterschiedlichen Stellen gestört werden kann. Die gestörte Surfactantfilmbildung kann wiederum ein Atemnotsyndrom oder eine interstitielle Lungenerkrankung zur Folge haben.

2.2 Atemnotsyndrom

Das neonatale Atemnotsyndrom (ANS) wird auch *respiratory distress syndrome* des Neugeborenen genannt und führt aufgrund von Surfactantmangel zu einer rasch progredienten Ateminsuffizienz [81]. Es betrifft in erster Linie Frühgeborene, da vor der 35. Gestationswoche, aufgrund der Unreife der Typ II Pneumozyten, nicht ausreichend Surfactant produziert werden kann [81]. Da der physiologische Surfactantfilm die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert und somit einen endexpiratorischen Kollaps der Lunge verhindert, kommt es bei Surfactantmangel folglich bereits kurz nach der Geburt zur Ausbildung von Atelektasen [81, 16, 15]. Durch die Minderbelüftung entsteht ein Ventilations-Perfusionsmissverhältnis innerhalb des Lungenkreislaufs. Dieses führt zur Ausbildung einer Hypoxie, sowie Hyperkapnie, was wiederum eine azidotische Stoffwechsellage nach sich zieht. Die lokale Hypoxie innerhalb der Lunge führt zudem über den Euler-Liljestrand-Mechanismus zu einer Vasokonstriktion der Lungengefäße [81, 16, 15]. Der hierdurch erhöhte pulmonale Widerstand löst einen Rechts-Links-Shunt auf Vorhofebene über das noch nicht vollständig verschlossene Foramen ovale sowie zudem über den Ductus arteriosus Botalli aus [81, 15]. Dies bewirkt eine weitere Progredienz der Hypoxie und somit auch der Azidose. Zusätzlich kommt es durch die lokale Hypoxie und Azidose innerhalb des kleinen Kreislaufs zu einer Schädigung der Alveolen sowie einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Durch den anschließenden Austritt von intravasaler Flüssigkeit entsteht ein Lungenödem. Des Weiteren bewirkt der Austritt von Fibrinogen und anderer Proteine die Formation hyaliner Membranen, welche die Alveolen auskleiden, die Surfactantbildung zusätzlich inhibieren und den Gasaustausch weiter verschlechtern [81, 16, 15].

Unmittelbar nach der Geburt zeigen die Säuglinge Zeichen der Dyspnoe, wie Nasenflügeln, interkostale und juguläre Einziehungen sowie endexpiratorisches Stöhnen. Zudem liegen meist eine Tachypnoe, Zyanose und Temperaturinstabilität vor. In der Auskultation fällt ein global abgeschwächtes Atemgeräusch auf. Die Diagnosesicherung erfolgt mithilfe einer Röntgen-Thorax-Untersuchung, in der sich eine deutliche Transparenzminderung der Lunge aufgrund von Atelektasen und Ödemen zeigt. Die Röntgenuntersuchung kann zusätzlich zur Stadieneinteilung des Atemnotsyndroms genutzt werden [81, 15].

Die Therapie sollte unter den Gesichtspunkten des *minimal handlings* erfolgen. Dieser Ansatz beschreibt die Notwendigkeit die Säuglinge durch die therapeutischen Maßnahmen so wenig wie möglich zu belasten. Trotzdem ist eine Atmungsunterstützung häufig unumgänglich, was nicht selten aufgrund von Barotrauma und Sauerstofftoxizität zu einer weiteren Schädigung der Alveolen führt. [81, 15, 9]

Dieser Circulus vitiosus kann nur durch den Aufbau eines ausreichenden Surfactantfilms unterbrochen werden. Hierfür stehen natürliche, aus Rinder- und Schweinelunge gewonnene Präparate sowie synthetisch hergestelltes Surfactant zur Verfügung [81]. Da Letzterer keine Apoproteine enthält, welche für die Ausbreitung des Surfactantfilms entscheidende Bedeutung haben, werden diesen Präparaten Alkohole und Detergenzien zugesetzt [81, 9]. Die intratracheale Bolusapplikation einer Initialdosis von 50-200mg/kg KG Surfactant führt unmittelbar zu einer Verbesserung der Beatmungssituation und Oxygenierung. Hierdurch werden geringere Beatmungsdrücke für eine ausreichende Ventilation benötigt, was wiederum das Risiko eines Barotraumas senkt. Zudem konnte sowohl für die Anwendung natürlicher als auch für die Verwendung synthetischer Präparate eine deutliche Reduktion der Mortalität um ca. 40% gezeigt werden [81, 9].

Wie oben erwähnt, betrifft das kindliche Atemnotsyndrom, aufgrund der Unreife der Lunge, hauptsächlich Frühgeborene vor der 35. Gestationswoche [81]. Es sind jedoch auch Fälle bekannt, bei denen das Atemnotsyndrom bei reifgeborenen Kindern aufgetreten ist. Während bei einigen dieser Patienten Mutationen im Gen des hydrophoben Surfactant Proteins B als Auslöser nachgewiesen werden konnten [58], blieb bei einer Vielzahl der erkrankten Kinder die Ursache zunächst weiter unklar. Bis schließlich Shulenin et al 2004 nachweisen konnten, dass die Mutation eines anderen Proteins, nämlich ABCA3, ebenfalls zur Entstehung eines akuten Atemnotsyndroms bei Neugeborenen führen kann [21]. Seither wurden Mutationen dieses ATP abhängigen Phospholipidtransporters [18] bei immer mehr Patienten mit zunächst unklaren Fällen des akuten Atemnotsyndroms nachgewiesen [6]. Es wird sogar vermutet, dass Mutationen im ABCA3-Gen für den Hauptteil der familiären Form des neonatalen Atemnotsyndroms verantwortlich sind [6]. Über die Funktion von ABCA3 im Allgemeinen und die Prozessierung dieses Phospholipidtransporters im Speziellen wird im Rahmen dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt noch genauer eingegangen.

2.3 ILD

Mutationen im ABCA3-Gen können neben dem akuten Atemnotsyndrom auch zur Entstehung einer anderen Krankheit, der sogenannten Interstitiellen Lungenkrankheit, führen [11].

Der Begriff Interstitielle Lungenerkrankung steht für eine heterogene Gruppe von respiratorischen Krankheitsbildern, die sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen auftritt, in beiden Altersgruppen aber zu unterschiedlichen Verläufen führen kann [1]. Im Kindesalter ist die Erkrankung äußerst selten, dafür aber durch eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate gekennzeichnet [10]. Im Mittelpunkt der meist chronisch verlaufenden Erkrankung steht eine gestörte Lungenfunktion, die sich sowohl in Form einer verminderten Diffusionskapazität als auch im Sinne einer restriktiven Funktionsstörung äußern kann und die Leitsymptome Dyspnoe und Tachypnoe bedingt [2]. Die Ursache für die gestörte Lungenfunktion sind entzündliche und fibrosierende Prozesse im Bereich des Lungeninterstitiums, welche zu diffusen pulmonalen Infiltraten und einer interstitiellen Verdickung führen und wiederum durch unterschiedliche Auslöser in Gang gesetzt werden können [10, 2, 3, 7].

Zu den bekannten Auslösern der ILD zählen inhalative Noxen, wie z.B. Asbestfasern und nicht-inhalative Noxen, wie radioaktive Strahlung. Auch Multisystemerkrankungen können eine ILD bedingen, als Beispiel hierfür sei die Sarkoidose genannt [4]. Oft bleibt der Auslöser jedoch unklar, weshalb in diesen Fällen von einer idiopathischen interstitiellen Lungenerkrankung (IIP) gesprochen wird [2].

Bei Kindern konnten in einem Teil der Fälle bei denen zunächst von einer IIP ausgegangen worden war, Mutationen im Surfactant-Protein B und C (SP-B und SP-C) als Auslöser der Erkrankung identifiziert werden [3, 5, 12]. Somit handelte es sich in diesen Fällen nicht um eine ILD idiopathischer Genese, sondern um eine vererbte Form der ILD. Trotzdem blieben bei einigen Kindern, bei denen aufgrund familiärer Häufung und ähnlicher Symptomatik, wie im Fall von SP-B und SP-C Mutationen, ebenfalls von einer genetischen Grundlage der IIP ausgegangen werden musste, die zugrundeliegenden Mutationen längere Zeit unbekannt. Aufgrund der Tatsache, dass neben SP-B- und SP-C-Mutationen auch der vollständige Ausfall der ABCA3-Funktion zu einem schwerwiegenden Surfactant-Mangel führen kann [21], kamen auch ABCA3 Mutationen als möglicher Auslöser einer ILD in Frage. Mittlerweile konnte von Bullard et. al gezeigt werden, dass durch Mutationen im Gen des Surfactant-Phospholipid-Transporters ABCA3 eine autosomal rezessiv vererbte Form der ILD entstehen kann [6]. Es ist davon auszugehen, dass in diesen Fällen, wie z.B. bei der Mutation

E292V, kein kompletter Ausfall, sondern lediglich eine Reduktion der ABCA3-Funktion vorliegt. [13, 6, 11].

Die Einteilung der ILD im Erwachsenenalter erfolgt, wie oben bereits angedeutet, anhand der Ätiologie [4]. Die IIP, bei der, wie der Name besagt, keine kausale Einteilung möglich ist, wird nach histopathologischen Kriterien weiter unterteilt. Beispiele hierfür sind die *Nonspecific interstitial pneumonia* und die *Desquamative interstitial pneumonia* [4].

Bei Kindern wurden über einen längeren Zeitraum dieselben Klassifikationsmodelle wie bei der adulten ILD verwendet. Dies ist nicht unproblematisch, da die ILD bei Kindern nicht nur deutlich seltener auftritt, sondern auch sehr variable und von der ILD im Erwachsenenalter deutlich abweichende Verläufe zeigt [3, 7]. So sind besonders bei Kindern unter 2 Jahren eigene Krankheitsbilder häufig, welche bei der adulten ILD nicht vorkommen, wie z.B. die *Neuroendocrine cell Hyperplasia*. Aus diesem Grund ist es wichtig, bei Kindern spezielle, von der ILD im Erwachsenenalter unabhängige, Klassifikationsmodelle zu verwenden [1, 3]. Ein mögliches Modell wurde von Deutsch et al. entwickelt. Es unterscheidet zunächst Krankheiten die in allen Altersgruppen eine Ausprägung finden, von denen, die nur in der frühen Kindheit auftreten. Letztere unterteilt er in fünf weitere Untergruppen: *Diffuse developmental disorders*, *Growth abnormalities*, *Neuroendocrine cell Hyperplasia of infancy* (NEHI), *Pulmonary interstitial glycogenosis* und *Surfactant dysfunction disorders*, zu welchen ABCA3 Mutationen zählen [8]. Dieses Modell geht somit auf die Besonderheiten der ILD bei Kindern unter 2 Jahren ein und sollte in Zukunft vermehrt Anwendung finden.

Die zahlreichen und aufwendigen Klassifikationsmodelle weisen bereits auf ein weiteres Problem der ILD hin, die Diagnose. Die bei Kindern große Variabilität der Krankheitsverläufe und die Überschneidungen innerhalb der einzelnen Untergruppen der ILD macht eine umfassende Diagnostik notwendig. Diese stützt sich auf mehrere Säulen. Hierzu zählen die Anamnese, körperliche Untersuchung und bildgebende Verfahren, genauso wie bei älteren Kindern die Lungenfunktionsdiagnostik. Als Goldstandard gilt die Lungenbiopsie, welche zwar eine histologische Zuordnung der Erkrankung erlaubt, allerdings zugleich das diagnostische Mittel mit der höchsten Invasivität darstellt [2, 7].

Zu den Symptomen der ILD zählen Hypoxie, welche zu Dyspnoe und Tachypnoe führt sowie unproduktiver Husten, Zyanose, Trommelschlägelfinger und Wachstumsretardierung [2, 3, 14]. In der Anamnese ist besonders die Frage nach der familiären Häufung von entscheidender Bedeutung, da diese einen ersten Hinweis auf das Vorliegen einer genetischen Ursache, wie Mutationen im ABCA3 Gen, geben kann. Bei der körperlichen Untersuchung

fallen häufig eine erhöhte Atemfrequenz sowie basal betonte inspiratorische Rasselgeräusche auf. In hieraufhin veranlassten Röntgenuntersuchungen der Lunge zeigen sich diffuse Infiltrate [3, 7, 14]. Das führende bildgebende Verfahren in der Diagnostik der ILD ist jedoch die HRCT (*high-resolution computed tomography*), welche es nicht nur ermöglicht, das Ausmaß und die genaue Verteilung des Krankheitsprozesses zu bestimmen, sondern in einigen Fällen auch hilfreich für die weitere diagnostische Zuordnung sein kann. So zeigen sich z.B. im Fall von NEHI charakteristische Veränderungen im HRCT, welche eine Lungenbiopsie unnötig machen [7]. Eine weitere Untersuchungsmethode, die die ätiologische Einteilung der ILD erleichtert, ist die Bronchoalveoläre Lavage mit anschließender zytologischer und mikrobiologischer Untersuchung des gewonnenen Materials [2]. Bei älteren Kindern kann zudem eine Lungenfunktionsdiagnostik durchgeführt werden. Hierbei zeigen sich eine in erster Linie restriktive Funktionsstörung sowie ein beeinträchtigter alveolärer Gasaustausch [2, 3, 7, 14].

Der große Aufwand, der in der Diagnostik betrieben wird, stellt die Grundlage für eine spezifische Therapie dar. Nur wenn die Krankheitsätiologie geklärt ist, kann diese eingeleitet werden. Zusätzlich zur spezifischen Therapie sollte in allen Fällen eine supportive Therapie eingeleitet werden [7]. Diese stützt sich vor allem auf eine ausreichende Versorgung der Patienten mit Sauerstoff. Gegebenenfalls muss eine unterstützende Beatmung eingeleitet werden. Zusätzlich sollte eine Infektionsprophylaxe erfolgen und auf eine ausreichende Energiezufuhr über die Nahrung geachtet werden. Des Weiteren kommt in den meisten Fällen von ILD eine immunsuppressive und antientzündliche Therapie mit Glukokortikosteroiden zum Einsatz [2, 7, 14]. Hierbei stellen die zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen ein großes Problem dar. Im Fall von Kindern sei besonders die Wachstumshemmung genannt [9]. Aus diesem Grund werden teilweise auch andere entzündungshemmende Medikamente, wie Hydroxychloroquin oder Azathioprin eingesetzt, um Kortikosteroide einzusparen [9]. Bei Kindern im Endstadium der Erkrankung wird als *Ultima Ratio* in einigen Fällen eine Lungentransplantation durchgeführt. Die Prognose ist hierbei vergleichbar mit der von Kindern mit pulmonaler Hypertonie [7].

Eine allgemeine Aussage über die Prognose der ILD lässt sich aufgrund der Heterogenität der Erkrankungsgruppe nicht stellen. 40-65% der Kinder sprechen auf eine Therapie mit Kortikosteroiden an, was jedoch nur bei einem Teil zur vollständigen Genesung führt [2]. Bei anderen schreitet die Erkrankung zur Lungenfibrose fort [2]. Fan et al. konnten zwar zeigen, dass ein sog. *severity-of-illness score*, welcher anhand von Symptomen, Ausmaß der Hypoxie

und Stadium der pulmonalen Hypertonie berechnet wird, als möglicher prognostischer Faktor genutzt werden kann [10], die Faktoren, welche ein Fortschreiten der ILD begünstigen, sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Es besteht vermutlich ein Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen. Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 15%. [11, 10, 2, 3].

Trotz der zahlreichen therapeutischen Ansätze wäre somit in vielen Fällen eine weitere Therapieoptimierung wünschenswert. Hierfür ist es wichtig, die ätiologischen und pathogenetischen Prozesse, die zur ILD führen, besser zu verstehen, denn ein besseres Verständnis der Pathogenese einer Erkrankung kann zur Identifizierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte genutzt werden. Die Pathogenese einer Erkrankung kann jedoch nur aufgeklärt werden, wenn zuvor die physiologischen Prozesse im Gesunden genauestens bekannt sind. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit mit der physiologischen Prozessierung von ABCA3, einem Protein, dessen Mutationen wie oben bereits erwähnt, zu einer *Surfactant dysfunction disorder* und somit zur ILD führen kann [11].

2.4 ABCA3

2.4.1 ABC-Familie

ABCA3 ist Teil der ABC-Familie, wobei ABC für "ATP-binding cassette" Transporter steht. Es handelt sich um eine Gruppe von Transmembranproteinen, welche die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen, um diverse Substrate durch Membranen zu transportieren [71]. ABC-Transporter kommen nicht nur beim Menschen vor, sondern lassen sich in zahlreichen Spezies bis hin zu Bakterien nachweisen, was ihre Bedeutung unterstreicht [70]. Diese wird auch daraus ersichtlich, dass Mutationen in den zugrundeliegenden Genen an der Entstehung unterschiedlichster Krankheitsbilder beteiligt sind. Neben den oben bereits mehrfach erwähnten ANS und der ILD aufgrund von ABCA3-Mutationen, seien besonders die Cystische Fibrose und die Tangier-Krankheit erwähnt. Beiden Erkrankungen liegt eine Fehlfunktion eines ABC-Transporters zugrunde [71].

Die ABC-Familie lässt sich in sieben Untergruppen unterteilen, die allerdings zahlreiche Gemeinsamkeiten im Aufbau und Transportmechanismus aufweisen. So besteht der klassische ABC-Transporter aus vier Untereinheiten. Zwei dieser Untereinheiten bilden den eigentlichen Kanal und durchspannen je nach Untergruppe extra- oder intrazelluläre Membranen. Sie sind in Form von alpha-Helices aufgebaut und für die Substratspezifität verantwortlich. Die anderen beiden Untereinheiten stellen die Bindungsstellen für ATP dar

und werden aus diesem Grund auch Nukleotidbindungsstellen genannt. Sie befinden sich meist auf der cytoplasmatischen Seite der Membranen. Man geht davon aus, dass die Bindung des jeweiligen Substrates an die Transmembranbestandteile des Transporters eine Konformationsänderung des Transporters zur Folge hat, was wiederum zur Hydrolyse von ATP an den Nukleotidbindungsstellen führt. Die hieraus gewonnene Energie kann schließlich zum Substrattransport genutzt werden [70, 71, Abbildung 3].

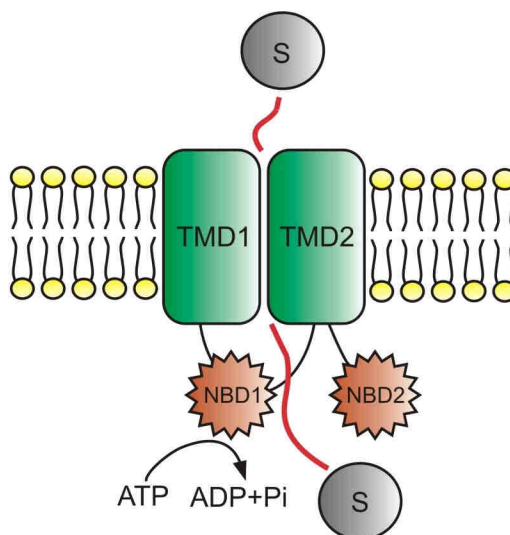


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung eines ABC-Transporters

Gezeigt ist die schematische Darstellung eines ABC-Transporters. TMD = Transmembrane Domain, NBD = Nucleotide-binding Domain, S = Substrat (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kern)

Die Substrate sind, wie oben bereits erwähnt, in Abhängigkeit der jeweiligen Untergruppe sehr unterschiedlich. Jedoch werden besonders häufig hydrophobe Substanzen transportiert. Die meisten ABC-Transporter sind hierbei sehr spezifisch in ihrer Substrataffinität. Es gibt aber auch Ausnahmen, welche unspezifisch arbeiten [70]. Die Transportrichtung verläuft meist ausgehend vom Zytoplasma, entweder aus der Zelle heraus oder hinein in intrazelluläre Kompartimente, wie das ER oder im Fall von ABCA3 in LBs [71, 72].

ABCA3 gehört zur Untergruppe ABCA, welche neben ABCA3 elf weitere Proteine beinhaltet. Die Mitglieder dieser Untergruppe weisen große Ähnlichkeiten in Bezug auf ihre DNA-Sequenzen auf und transportieren in erster Linie Lipide. Sie werden zum Teil für multiple Resistenzen von Karzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht [72].

2.4.2 ABCA3: Gen und Protein

Das ABCA3-Gen hat eine Größe von 80kb und befindet sich auf Chromosom 16 [6]. Die genaue Position im menschlichen Genom lautet 16p13.3 [72]. Es besteht aus 33 Exons, wovon wiederum 30 für insgesamt 1704 Aminosäuren kodieren [6]. ABCA3 wird in erster Linie in den Typ II Pneumozyten der Lunge exprimiert. Es konnte jedoch auch in anderen Geweben, wie z.B. Herz oder Gehirn, nachgewiesen werden, wenn auch in bedeutend geringerem Ausmaß [6].

Im Anschluss an die Translation passiert ABCA3 das ER und wird im Golgi-Apparat glykosyliert, bevor es schließlich seinen eigentlichen Wirkort, die LBs erreicht [40]. Wie die anderen Mitglieder der ABC-Familie, so besteht auch ABCA3 aus zwei Transmembrananteilen, sowie zwei Nukleotidbindungsstellen [70]. Im Western Blot kommt C-terminal mit HA (*Human influenza hemagglutinin*) markiertes ABCA3 in Form von zwei Banden zur Darstellung, welche eine Größe von 150 bzw. 190 kDa aufweisen [Abbildung 4].

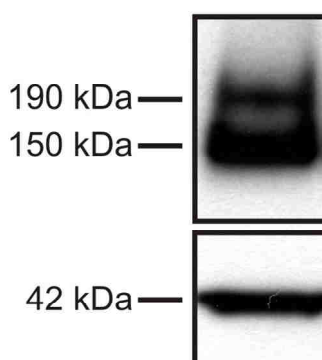


Abbildung 4: Western Blot mit C-terminal mit HA-markiertem ABCA3-WT

ABCA3 kommt in Form von 2 Banden zur Darstellung. Die obere Bande weist eine Größe von 190kDa auf, die untere Bande ist 150kDa groß. Als Ladungskontrolle wurde beta-actin verwendet, welches ein 42kDa großes Protein ist.

Bisher wurde zwar davon ausgegangen, dass die kleinere Form durch proteolytische Spaltung aus der größeren Form hervorgeht [13,20], ein Beweis hierfür wurde aber bisher nicht erbracht. Und auch eine genauere Identifizierung der einzelnen Prozessierungsschritte ist bisher nicht erfolgt, weshalb sich diese Arbeit mit der Prozessierung von ABCA3 im Allgemeinen und der Bedeutung der unterschiedlich großen Formen von ABCA3 für die Proteinfunktion im Speziellen beschäftigt.

2.4.3 Funktion von ABCA3

Wie oben bereits mehrfach erwähnt, können Mutationen im ABCA3 Gen zur Entstehung von ANS und ILD führen [6]. Dies verdeutlicht die Bedeutung von ABCA3 für die Lungenfunktion. Die genaue Wirkungsweise von ABCA3 war jedoch lange Zeit unbekannt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass ABCA3 unter anderem an der Bildung von LBs maßgeblich beteiligt ist [17, 18, 77]. So konnten Nagata et al demonstrieren, dass es in HEK-Zellen, welche ABCA3 exprimieren, zur Ausbildung von Organellen kommt, welche große Gemeinsamkeiten mit LBs aufweisen. Diese Strukturen konnten in nicht-transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden [22]. Auch in den Typ II Pneumozyten von ABCA3 *knock-out* Mäusen waren keine LBs nachweisbar und die Tiere verstarben kurz nach der Geburt [17]. Ebenso führte die Ausschaltung von ABCA3 mittels siRNA zur Bildung abnormaler LBs in zudem verringerter Menge [24]. Da LBs als Speicherort für die einzelnen Surfactantbestandteile dienen, ist es verständlich, dass eine gestörte Synthese dieser Organellen massive Auswirkungen auf die Lungenfunktion nach sich zieht [21].

Dies ist jedoch nicht die einzige Funktion von ABCA3. Wie auch die anderen Proteine aus der ABC-Familie fungiert ABCA3 in erster Linie als Transporter. So gelangen Phospholipide mit Hilfe von ABCA3 unter ATP-Verbrauch in das Innere von LBs [18, 24]. Erste Hinweise hieraus ergaben sich wiederum aus der Untersuchung von Lungen von ABCA3 *knock-out* Mäusen. Der Surfactantfilm dieser Tiere wies eine gestörte Surfactantfilmzusammensetzung und insbesondere einen Mangel an ungesättigtem Phosphatidylcholin sowie Phosphatidylglycerol auf [18]. Zudem konnten Matsumura et al zeigen, dass Mutationen von ABCA3 im Vergleich zum WT zu einem verringerten Phospholipidgehalt in A549 Zellen führen können und die LAMP3-positiven Vesikel, zu welchen wie oben erwähnt auch LBs zählen, innerhalb dieser Zellen deutlich kleiner ausfielen als bei Zellen, welche die WT-Variante von ABCA3 exprimierten [19]. Ergänzend hierzu fanden Cheong et al heraus, dass die Inhibition der ABCA3 Expression mittels siRNA zu einer verringerten Aufnahme von Surfactantlipiden in humane Typ II Pneumozyten führt [24].

Zusammenfassend bedeutet dies, dass ABCA3 für die Entstehung von LBs und somit für die Bildung eines funktionsfähigen Surfactantfilms unbedingt notwendig ist.

Die Bedeutung von Surfactant für die Atmung wurde oben bereits näher erläutert. Besonders gut lässt sie sich jedoch an der Umstellung des fetalen Kreislaufs unmittelbar nach der Geburt aufzeigen. Da das Neugeborene nach Trennung der Nabelschnur nicht länger über das Blut der Mutter mit Sauerstoff versorgt wird, kommt es zu einem Sauerstoffmangel und Anstieg

des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks, welcher beim Neugeborenen zum Atemreiz führt, weshalb es zu Schreien beginnt. Erst der Surfactantfilm ermöglicht nun die vollständige Entfaltung der Lunge. Hierdurch verringert sich der Gefäßwiderstand im Lungenkreislauf und diese wird nicht länger durch das Foramen ovale, bzw. den Ductus arteriosus Botalli umgangen. Der kindliche Kreislauf ist nun an die neue Umgebung angepasst [81]. Ohne funktionstüchtigen Surfactantfilm wäre diese Anpassung nicht möglich. Somit ist die Synthese von Surfactant kurz vor der Geburt besonders wichtig ist. Da ABCA3 an der Bildung von Surfactant beteiligt ist, muss auch dieses Protein vor der Geburt verstärkt exprimiert werden und trägt somit Anteil an der Lungenreifung vor der Geburt. Mulugeta et al konnten zeigen, dass ABCA3 in der Lunge von Ratten ein bis zwei Tage vor Geburt ein Maximum der Expressionsrate erreicht [68]. Mittlerweile konnte zudem nachgewiesen werden, dass der Promotor des ABCA3-Gens durch Glukokortikoide aktiviert werden kann und somit ABCA3 unter dem Einfluss dieser Substanzen verstärkt exprimiert wird [73]. Dies erklärt die Wirkung präpartal eingesetzter Glukokortikoide zur Lungenreifung und unterstreicht erneut die Bedeutung von ABCA3 für eine ungestörte Lungenfunktion.

Auch scheint ABCA3 einen Einfluss auf die Prozessierung der Surfactant-Proteine B und C zu haben [77].

Neben diesen Funktionen, welche ABCA3 in Typ II Pneumozyten entfaltet, konnte zudem gezeigt werden, dass ABCA3 neben Phospholipiden auch andere Substrate transportiert. So wird ABCA3 u.a. in einer Untergruppe von Stammzellen verstärkt gebildet, welche eine ausgeprägte Fähigkeit zur Ausschleusung von Chemotherapeutika haben [56]. Und auch in Blasten von Patienten mit AML, welche ein schlechtes Ansprechen auf eine Chemotherapie zeigten, konnte eine verstärkte Expression von ABCA3 nachgewiesen werden [55], so dass derzeit davon ausgegangen werden kann, dass ABCA3 für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in einigen Krebsarten mit verantwortlich ist [74].

2.4.4 Prozessierung von ABCA3

Über die Prozessierung von ABCA3 ist bisher wenig bekannt. Gezeigt werden konnte bisher nur, dass im Anschluss an die Transkription und Translation eine Glykosylierung von ABCA im ER und Golgi-Apparat erfolgt [20, 75] und es anschließend über die Zwischenstufe der MVBs und CBs die LBs erreicht [68, 69, 75].

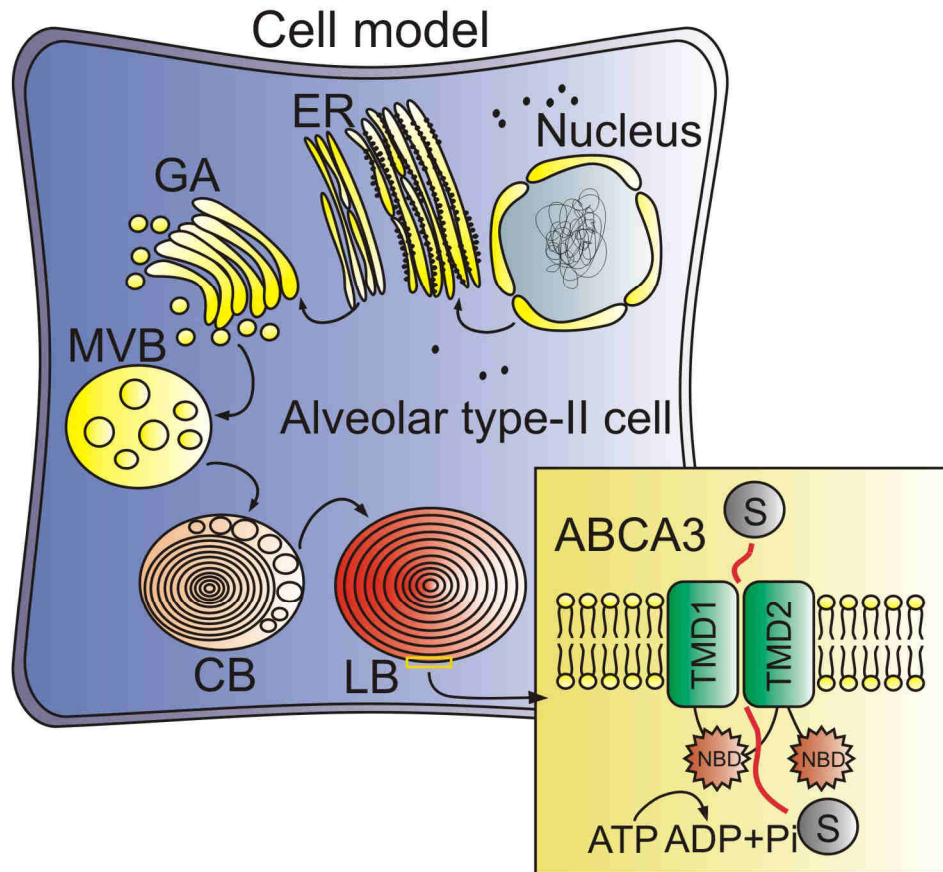


Abbildung 5: Bisher bekannte Schritte der ABCA3 Prozessierung

Zunächst erfolgen Transkription und Translation. Im Anschluss hieran passiert ABCA3 das ER, den GA, sowie die MVBs und CBs, bevor es die LBS erreicht.

ER = Endoplasmatisches Retikulum, GA = Golgi-Apparat, MVB = Multi vesicular body, CB = Composite body, LB = Lamellar Body (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kern)

Im Rahmen der Glykosylierung werden sowohl mannosehaltige Zuckermoleküle als auch komplexe Zuckermoleküle an den N-Terminus von ABCA3 angebracht [75].

Weitere gesicherte Daten zur Prozessierung von ABCA3 gab es bisher nicht. Über die übrigen Schritte bestanden lediglich Vermutungen. So wurde aufgrund der Tatsache, dass ABCA3 im Western Blot in Form von zwei Banden zur Darstellung kommt, davon ausgegangen, dass die kleinere Form durch posttranslationale Modifizierung aus der größeren Form hervorgeht [20, 22, 24]. Ein Beweis hierfür ist jedoch bisher nicht erbracht worden.

Des Weiteren führten Ergebnisse von Studien zu anderen Proteinen aus der ABC-Familie zu Hypothesen über die mögliche Prozessierung von ABCA3 [23]. So konnten Tanaka et al zeigen, dass ABCA1 N-terminal proteolytisch gespalten wird [23], weshalb derzeit vermutet

wird, dass auch ABCA3 in dieser Weise prozessiert wird. Ein Beweis hierfür konnte jedoch bisher genauso wenig erbracht werden, wie eine Identifizierung des verantwortlichen Enzyms oder des Ortes der proteolytischen Prozessierung. Dies ist Ziel dieser Arbeit.

2.4.5 ABCA3 Mutationen

2.4.5.1 Einteilung

Es konnten mittlerweile zahlreiche Mutationen von ABCA3 identifiziert werden, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden können [13, 20]. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um so genannte Fehlfaltungsmutationen [79], diese führen, wie der Name sagt, zu einer fehlerhaften Faltung des Proteins. Dies hat zur Folge, dass die weitere Prozessierung unterbleibt, ABCA3 im ER retiniert oder sogar abgebaut wird [20, 24]. Zu diesen Mutationen zählt u.a. Q215K [78].

Im Fall der zweiten Gruppe ist die Faltung und somit auch die Prozessierung von ABCA3 nicht gestört, jedoch wird ein Protein mit mangelnder oder fehlender Funktion gebildet [20]. Zu dieser Gruppe zählen sowohl Mutationen mit gestörter ATP-Bindungsfähigkeit, als auch mit verringerter ATP-Hydrolyse-Aktivität [20]. Ein Beispiel für diese Gruppe stellt die Mutation E292V [13].

Auf beide oben genannte Mutationen soll im Folgenden exemplarisch eingegangen werden.

2.4.5.2 Q215K

Q215K führt durch eine Mutation in Exon 8 an Position 643 der cDNA zu einer Proteinefehlfaltung und ER-Retention von ABCA3 [78]. Folglich ist ABCA3 im Falle dieser Mutation mithilfe der Immunfluoreszenz lediglich im ER, nicht jedoch in LBs nachweisbar [78, Abbildung 28: Seite 70] und auch im Western Blot kommt Q115K anstelle von zwei Banden lediglich in Form einer Bande zur Darstellung, welche abhängig vom verwendeten Marker eine Länge von 220 bzw 190 kDa aufweist (Abbildung 6).

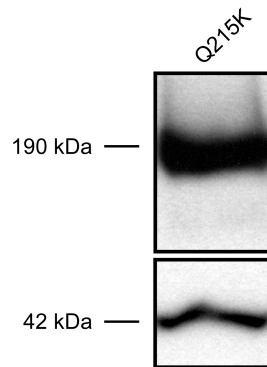


Abbildung 6: Western Blot mit C-terminal mit HA-markierter ABCA3-Q215K-Mutante

Es zeigt sich nur eine 190kDa große Bande, kein Nachweis einer 150kDa großen Form von ABCA3. Als Ladungskontrolle wurde beta-actin verwendet, welches ein 42kDa großes Protein ist.

Aufgrund der ER-Retention kommt es zu einem kompletten Funktionsverlust von ABCA3 und sowohl der Phospholipidtransport als auch die Synthese der LBs kann nicht stattfinden. Dies hat die Ausbildung eines schweren Atemnotsyndroms mit Tod kurz nach der Geburt zur Folge [77].

2.4.5.3 E292V

Die Mutation E292V im ABCA3-Gen tritt in den USA mit einer Prävalenz von 1:277 auf und ist somit die häufigste bisher bekannte ABCA3-Mutation [80]. Es handelt sich um eine "missense" Mutation in Exon 9 an Position 875 der cDNA. Diese führt zu einem Austausch von Glutamin gegen Valin im Codon 292 [11].

Mithilfe von Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass E292V wie WT-ABCA3 in LBs lokalisiert ist [13, Abbildung 21: Seite 65] und im Western Blot ebenfalls wie der WT in Form von zwei Banden 190kDa und 150kDa zur Darstellung kommt (Abbildung7) [13].

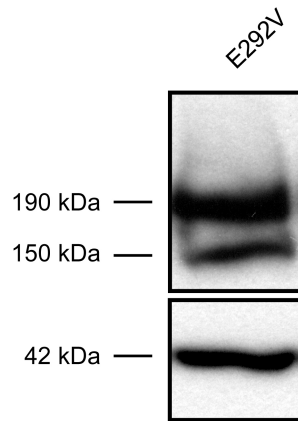


Abbildung 7: Western Blot mit C-terminal mit HA-markierter ABCA3-E292V-Mutante

ABCA3 kommt, wie beim WT, in Form von 2 Banden zur Darstellung. Die obere Bande weist eine Größe von 190kDa auf, die untere Bande ist 150kDa groß. Als Ladungskontrolle wurde beta-actin verwendet, welches ein 42kDa großes Protein ist.

Die Lipid-Transportfunktion der E292V Mutante ist im Gegensatz zu den Fehlfaltungsmutationen noch teilweise erhalten [11, 13]. Die Ursache der verminderten Funktion scheint in einer verringerten ATP-Hydrolyse-Aktivität zu liegen, während die ATP-Bindung an ABCA3 unbeeinträchtigt bleibt [13]. Da die Funktion von ABCA3 noch teilweise erhalten ist, sind auch die Auswirkungen der Mutation nicht so ausgeprägt wie im Falle von Q215K. So konnte gezeigt werden, dass E292V zur Entstehung der pädiatrischen ILD, nicht jedoch zum Auftreten eines neonatalen ANS führt und die Patienten teilweise das frühe Erwachsenenalter erreichen [11, 13, 20].

2.5 Zielsetzung

ABCA3 ist ein Phospholipidtransporter, welcher für die Bildung eines funktionsfähigen Surfactantfilms unverzichtbar ist [11, 21]. Bisher konnte gezeigt werden, dass Mutationen im ABCA3-Gen sowohl zur Ausbildung eines neonatalen Atemnotsyndroms als auch zur Entstehung der interstitiellen Lungenerkrankung führen können. In Bezug auf beide Erkrankungen stehen bisher keine ausreichenden Therapieoptionen zur Verfügung.

Über die Prozessierung von ABCA3 ist jedoch nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, neue Erkenntnisse über die WT-Prozessierung zu erlangen, welche hoffentlich in Zukunft genutzt werden können, um Fehler in der Prozessierung von ABCA3 Mutationen zu identifizieren und Ansatzpunkte für neue kausale Behandlungsstrategien in der Therapie der familiären ILD und des Atemnotsyndroms zu finden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborinstrumente

Axiovert 135 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Cell Culture Bench Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Cool Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo Container	Nalgene, Rochester, USA
Developing Cassette	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Developer Machine CP 1000	AGFA, Mortsel, Belgien
Digital Sonifier®	Branson, Danbury, USA
Eisschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Eisschrank -80°C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Excella E24 Incubator Shaker Series	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
High Performance Centrifuge Avanti J-30	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Icycler Real-Time PCR-System	Bio-Rad, München, Deutschland
Inkubator HeraCell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Liquid Nitrogen Tank	German-Cryo, Jücken, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrotiterplattenleser Hat III Typ 12600	Anthos, Krefeld, Deutschland
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zellkammer	Brand, Berlin, Deutschland
PH-Meter CG 840	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetten (2,5µl, 10µL, 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL, 5mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerEase 500 Power Supply EI8700	Life Technologies, Carlsbad, USA
Shaker Excella E24	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Systec D65 Autoclave	Systec, Wetztenberg, Deutschland
Thermoblock TDB-120	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Labnet, Edison, USA
Wasserbad Paratherm S100	Julabo, Seelbach, Deutschland
Xcell SureLock Minicell Kammer (EI 0001)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Xcell II Blot Module EI9051	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well Mikrotiterplatten (niedrigaffin, transparent)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Adhäsionsfilm	R&D systems, Wiesbaden, Deutschland
Cryo-Tubes (1,8mL)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Einmal-Küvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Immobilon P PVDF Membran	Millipore, Billerica, USA
NuPAGE Novex Gel 3-8% Tris-Azetat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger und Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filtereinheit (2,5µl, 10µL, 100µL, 1000µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (2,5µl, 10µL, 20µL, 200µL, 1000µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Radiographischer Film	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Reaction Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkultur-Flaschen 250mL, 750mL	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Platten (96-, 24-, 12-, 6-Well)	Corning Incorporated, Corning, USA
Zentrifugier-Tubes (10ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugier-Tubes (15mL, 50mL)	BD, Heidelberg, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Fluka, St. Louis, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Paesel + Lorei, Duisburg, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Crystal Violet	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
E64	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka, St. Louis, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung für Injektionszwecke	Braun, Melsungen, Deutschland

Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Monensin Sodium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinassay Farbstoffreagenz	Bio-Rad, Hercules, USA
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TWEEN-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.4 Puffer und Lösungen

PBS-T (pH7,4)

KCl	2,7 mM
KH_2PO_4	1,8 mM
Na_2HPO_4	10,0 mM
NaCl	136,9 mM
Tween-20	0,1%

TBS-T

Na_2HPO_4	10,0 mM
NaCl	150 mM
Tris (pH 7,5)	50,0 mM
Tween-20	0,1 %

Radioimmunoprecipitation Puffer (RIPA)

Proteaseinhibitor (Sigma)	1x
EDTA (pH 8)	5 mM
NaCl	0,15 mM

3 Material und Methoden

Natriumdeoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
Tris (<i>pH</i> 8)	50,0 mM
Triton-X 100	1 %

Lyse Puffer

Hepes pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Igepal	0,6%
Proteaseinhibitor (Sigma)	1 µg/ml
NaF	25mM
Glycerophosphate	50mM
Calyculin A	1%

Homogenization Buffer A in PBS

EDTA	2mM
Proteaseinhibitor (Sigma)	1x

Resuspension Buffer B

Hepes pH 7,0	25 mM
Proteaseinhibitor (Sigma)	1x

Nuclear Extraction Buffer

Hepes pH 7,9	20 mM
NaCl	420 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Glycerol	25 %
Proteaseinhibitor (Sigma)	1 µg/ml
NaF	25mM
Glycerophosphate	50mM
Calyculin A	1%

SDS-Lyse Buffer

Tris pH 7,4	0,1 mM
SDS	0,2 %
EDTA	1 mM

Transfer-Buffer für Western Blot

Methanol	10 %
Transfer-Puffer (Invitrogen)	1x

TAE Buffer (10x), pH 8,5

Tris base	0,4 M
Glacial acetic acid	0,2 M
EDTA	0,01 M

Block-/Antikörperpuffer für Immunfluoreszenz-Mikroskopie (in PBS)

BSA	1 %
FBS	5 %

Probenpuffer für Agarosegel-Elektrophorese

Tris-HCL pH7,5	10 mM
Sucrose	40%
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
EDTA	50mM

Gebrauchsfertige Pufferlösungen

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
Crystal Violet Loading Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE Tris-Acetat Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Glycoprotein Denaturation Buffer	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
G7 Reaction Buffer	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
G5 Reaction Buffer	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland

3.1.5 Kits

ECL Chemilumineszenz Lösung	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
NucleoBond Plasmid DNA Purification Endotoxinfree	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Extract II 50	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NuPAGE Elektrophorese Set	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit 50	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit 50	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit 50	Qiagen, Hilden, Deutschland
Topo-Cloning Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
VectaShield® Hardset Eindeckmedium mit DAPI	Vector Labs, Burlingame, USA
VenorGeM Mycoplasmen-Nachweis	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
Western Breeze	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Enzyme

AgeI	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
EcoRI	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
HindIII	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
KpnI	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
Pfu Ultra™ Hotstart DNA Polymerase	Stratagene, San Diego, USA
PNGase F	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
Endo H	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
XhoI	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland

3.1.7 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Blasticidin	Invivogen, San Diego, USA
ExGen500 in vitro Transfektions-Reagenz	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Fetal Bovine serum (FBS) "Gold"	PAA lab. GmbH, Pasching, Österreich
LB-Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Bouillon	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA lab. GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640 Medium	PAA lab. GmbH, Pasching, Österreich
Trypan blue solution	PAA lab. GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA lab. GmbH, Pasching, Österreich

3.1.8 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Typ, Host
β-Actin – HRP conjugate	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	monoclonal, mouse
Calnexin	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	polyclonal, rabbit
GFP-Taq	Clontech, Mountain View, USA	monoclonal, mouse
HA (High Affinity)-Taq	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland	monoclonal, rat
Lamp-3	Chemicon, Hofheim, Deutschland	monoclonal, mouse
Sekundäre Antikörper Western Blot	Hersteller	
Mouse-IgG - HRP conjugate	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
Rat IgG – HRP conjugate	Dako, Glostrup, Dänemark	
Sekundäre Antikörper Immunfluoreszenz	Hersteller	
Goat-anti-mouse Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	
Donkey-anti-Rat Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	

3.1.9 Längen- und Größenstandards

Novex Sharp Prestained Protein Standard

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.10 Primer

Tabelle 2: Verwendete Primer

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Annealing-temperatur	Länge
ABCA3-XhoI-For2	GCCGCGCTCGAGCTATGGCTGTG CTCAGGCAGCTG	57,2°C	35
ABCA3-KpnI-Rev2	GGCCGCGGTACCTCGCCCCTCCTC TGCGGT	57,2°C	30

3.1.11 Zelllinien

A549 (humane Typ II Lungenepithelzellen #ACC 107)

DMSZ, Braunschweig, Deutschland

DH5α (*Escherichia coli* Stamm)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

HEK 293 (Human embryonic kidney Zellen)

DMSZ, Braunschweig, Deutschland

3.1.12 Vektoren

pcDNA3/hABCA3 WT	Erstellt von Klugbauer/Holzinger
pEGFP-C1	Clontech, Mountain View, USA
pUB6/hABCA3-HA WT	Erstellt von M. Woischnik
pUB6/hABCA3-HA E292V	Erstellt von E. Kaltenborn
pUB6/hABCA3-HA Q215K	Erstellt von E. Kaltenborn

3.2 Methoden

3.2.1 Klonierung des GFP^N-ABCA3-WT-Vektors

3.2.1.1 Vorarbeiten

3.2.1.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in E.coli Zellen

Die Expression von ABCA3 mit N-terminalem GFP erforderte die Klonierung von WT-hABCA3 cDNA in einen pEGFP-C1-Plasmid. Bevor mit der Klonierung begonnen werden konnte, mussten zunächst die benötigten Plasmide in ausreichendem Maß gewonnen werden. Hierfür wurden zunächst pEGFP-C1- sowie pcDNA3 ABCA3 WT- Vektoren in E.coli (DH5 α) transformiert.

Zu 100 μ l der auf Eis aufgetauten kompetenten DH5 α Zellen wurde 1 μ l der benötigten Plasmid-DNA pipettiert und dieser Ansatz anschließend 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein 60-sekündiger Hitzeschock bei 42°C erfolgte. Danach mussten die Zellen für weitere 3 min auf Eis, bevor sie in 1ml LB-Medium (Raumtemp.) überführt werden konnten. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss eine Stunde bei 37°C im Schüttelmixer inkubiert und schließlich bei Raumtemperatur für drei Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 μ l abpipettiert und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Im Anschluss daran konnten die Zellen auf Agarplatten verteilt werden. Die Identifikation der transformierten E.coli-Zellen erfolgte mittels Antibiotika. Die Agarplatten enthielten Ampicillin (100 μ g/ml) bzw. Kanamycin (30 μ g/ml). Da der pcDNA3 ABCA3 WT- Vektor ein Ampicillinresistenzgen und der pEGFP-C1-Plasmid ein Kanamycinresistenzgen aufwiesen, konnten sich nur die Zellen vermehren, die das entsprechende Plasmid enthielten.

3.2.1.1.2 E.coli Zellkultur und Plasmidisolierung

Die transformierten E.coli wurden mittels einer Pipettenspitze von den Agarplatten in 5 ml LB-Bouillon überführt. Dem Medium war zuvor die entsprechende Menge Ampicillin

(100µg/ml) bzw. Kanamycin (30µg/ml) zugegeben worden. Aus den über Nacht bei 37°C im Schüttelmixer inkubierten Kulturen konnten die Plasmide unter Anwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert werden.

3.2.1.1.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

Um zu bestätigen, dass die gewünschten Plasmide isoliert worden waren, wurden diese mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Länge der Fragmente mithilfe einer DNA-Elektrophorese bestimmt. Im Folgenden sind die verwendeten Reaktionsansätze zu sehen.

Tabelle 3: Reaktionsansätze DNA-Elektrophorese mit pcDNA3 ABCA3 WT

Anzahl Schnittstellen	1x		2x	
	DNA	1,5 µl ≈ 664ng	DNA	1,5 µl ≈ 664ng
	10x Buffer 2	2,0 µl	10x Buffer EcoR I	2,0 µl
	Hind III	1,0 µl ≈ 20U	EcoR I	1,0 µl ≈ 20U
	H ₂ O	15,5 µl	H ₂ O	15,5 µl
	V _{gesamt}	20µl	V _{gesamt}	20µl

Tabelle 4: Reaktionsansätze DNA Elektrophorese mit pEGFP-C1

Anzahl Schnittstellen	1x		2x	
	DNA	2,0 µl ≈ 974ng	DNA	2,0 µl ≈ 974ng
	10x Buffer EcoR I	2,0 µl	10x Buffer 1	2,0 µl
	EcoR I	1,0 µl ≈ 20U	Kpn I	1,0 µl ≈ 10U
			Age I	1,0 µl ≈ 5U
			BSA	2,0µl
	H ₂ O	15,0 µl	H ₂ O	12,0 µl
	V _{gesamt}	20µl	V _{gesamt}	20µl

Die Reaktionsansätze wurden mit Probenpuffer vermischt und in die Taschen eines 1% Agarosegels pipettiert. Zur Herstellung des Gels wurden 1g des Agarosepulvers mit 100 ml TAE-Buffer aufgekocht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach einer Abkühlzeit von 5-10 min konnten 10 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in einen Gelträger gegossen werden. Zusätzlich erfolgte das Auftragen eines DNA-Längenstandards. Die Auftrennung der

DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 130V über eine Dauer von einer Stunde, wobei die negativ geladenen Fragmente in Richtung der Anode wanderten. Mithilfe von UV-Licht konnten die DNA-Fragmente im Anschluss an die Elektrophorese sichtbar gemacht und fotodokumentiert werden.

Da die DNA-Fragmente die zu erwartenden Größen aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den isolierten Plasmiden um pcDNA3 ABCA3 WT (11704 bp) und pEGFP-C1 (4731 kb) handelte (Abbildung 8).

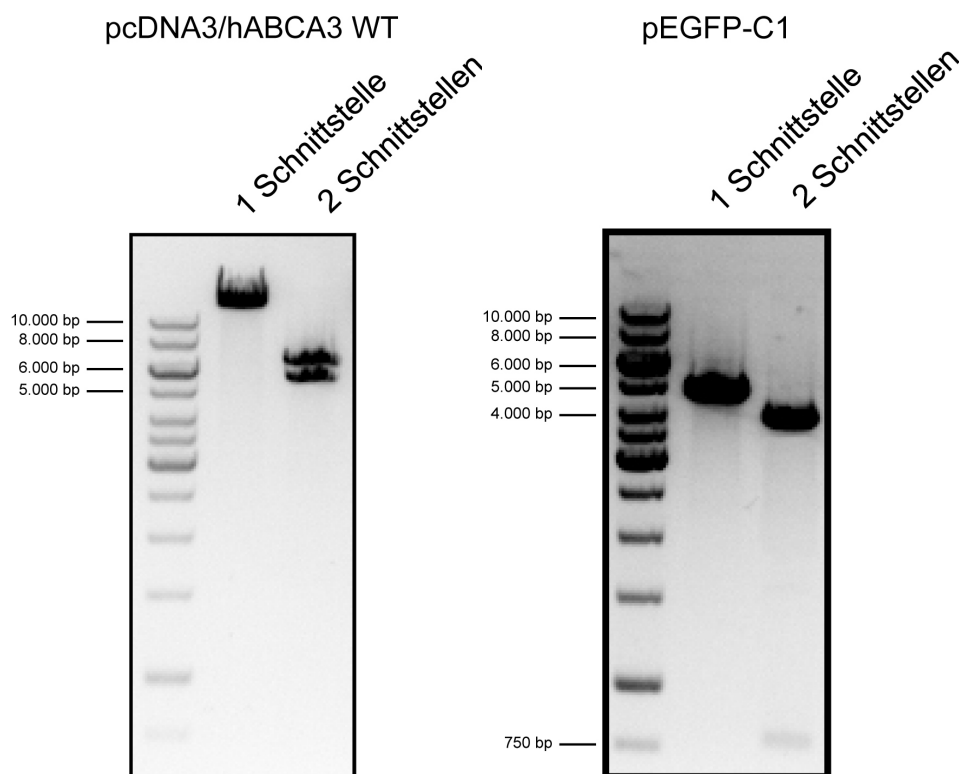


Abbildung 8: Kontrolle der Plasmidisolierung mittels Agarosegel-Elektrophorese

Durch den Restriktionsverdau und die anschließend durchgeführte Agarosegel-Elektrophorese konnte bewiesen werden, dass die gewünschten Plasmide pcDNA3 ABCA3 WT (11704 bp, links) und pEGFP-C1 (4731 kb, rechts) isoliert worden waren.

3.2.1.2 DNA- Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Anschluss an die Isolierung der benötigten Plasmide wurde eine PCR durchgeführt, um hABCA3 WT cDNA aus dem pcDNA3 ABCA3 WT-Vektor zu erhalten. Diese Methode wurde gewählt, da es mittels PCR möglich ist, einen spezifischen DNA-Abschnitt selektiv zu

vervielfältigen (Amplifizierung). Hierzu müssen die Sequenzen an den Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts bekannt sein, da sich an diese zu Beginn der PCR komplementäre Oligonukleotide (Primer) anlagern. Die Primer (im vorliegenden Fall: ABCA3-XhoI-For2 und ABCA3-KpnI-Rev2) dienten nicht nur als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase. Vielmehr wurde bei ihrem Design darauf geachtet, dass sie die Schnittstellen für den späteren Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit den Restriktionsenzymen Xho I und Kpn I enthielten. Bei der gewählten DNA-Polymerase handelte es sich um die Pfu UltraTM Hotstart DNA Polymerase von Stratagene. Diese ist hitzestabil und erkennt zudem fehlerhaft angelagerte dNTPs, welche durch zur Matrize komplementäre dNTPS ausgetauscht werden. Sie ist somit besonders zur Vervielfältigung längerer DNA-Abschnitte geeignet, wie es bei der ABCA3 WT cDNA der Fall ist. Ein PCR-Zyklus lief folgendermaßen ab:

Zu Beginn der PCR musste der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge, welche später als Matrize dienten, gespalten werden. Hierzu wurde eine Temperatur von ca. 95°C benötigt (Hitzenaturierung). Im Anschluss hieran musste die Temperatur auf 50-70°C gesenkt werden, damit es zur Hybridisierung der Oligonukleotide mit den Einzelsträngen kommen konnte (Annealing). Die genaue Temperatur war hierbei abhängig von der Basenabfolge und Länge der jeweiligen Primer und betrug in diesem Fall 57,2°C. Der nächste Schritt war die Elongation. Hierbei synthetisierte die DNA-Polymerase ausgehend vom Primer einen zum Matrizen-Strang komplementären DNA- Abschnitt in 5'- 3'- Richtung. Während dieses Zeitraums wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Dies entsprach dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase. Die Trennung der neu gebildeten Stränge von der Matrize erfolgte durch erneute Temperaturerhöhung auf 95°C. Durch 25-30-fache Wiederholung des Zyklus aus Hitzenaturierung, Annealing und Elongation konnte der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden.

Im Folgenden ist der zeitliche Ablauf der PCR dargestellt:

Tabelle 5: Zeitlicher Ablauf PCR

Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
2 min	95°C	1
30 sec	95°C	28x
30 sec	57,2°C	
5 min	72°C	
10 min	72°C	1
10 min	4°C	1

3.2.1.3 Größenbestimmung des PCR-Produkts mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Überprüfung der Größe des PCR-Produkts (erwartete Größe 5141bp) erfolgte mithilfe der Agarosegel-Elektrophorese auf einem 1% Gel (s.o.). Die Spannung betrug 130V und die Laufzeit eine Stunde (Abbildung 9).

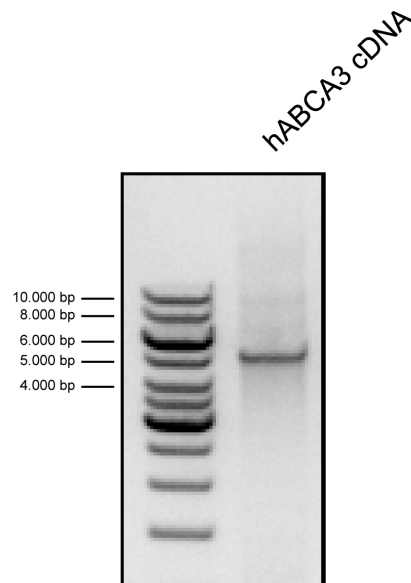


Abbildung 9: Größenbestimmung des PCR-Produkts mittels Agarosegel-Elektrophorese

Es zeigt sich eine Bande mit der erwarteten Größe 5141bp.

Nachdem die korrekte Länge des PCR-Produkts bestätigt worden war, konnte es mit dem QIAquick® PCR Purification Kit 50 von QIAGEN aufgereinigt werden.

3.2.1.4 Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkt

Um die Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor zu ermöglichen, mussten sowohl hABCA3 WT cDNA als auch pEGFP-C1 mit den Restriktionsenzymen Xho I und Kpn I verdaut werden. Restriktionsenzyme erkennen sog. DNA-Palindrome. Hierbei handelt es sich um Sequenzen eines DNA-Doppelstrangs, bei denen die Basenabfolge der komplementären Stränge in 5'-3'-Richtung identisch ist. Diese Sequenzen werden von den spezifischen Restriktionsenzymen erkannt und die DNA an dieser Stelle gespalten. Vektor und PCR-Produkt müssen jeweils Schnittstellen für beide Restriktionsenzyme enthalten. Aus diesem

Grund wurden Xho I und Kpn I gewählt. Des Weiteren kam es durch ihren Einsatz zur Ausbildung von sog. *sticky ends*, was eine spätere Ligation erleichterte.

Die Restriktionsansätze sahen wie folgt aus (37°C, über Nacht):

Tabelle 6: Reaktionsansatz Plasmid DNA- und PCR Produktverdau

	hABCA3 WT cDNA	pEGFP-C1
DNA	50µl	30µl
10 x Buffer 1	7µl	7µl
Kpn I	2µl ≈ 20U	2µl ≈ 20U
BSA	7µl	7µl
ddH ₂ O	4µl	24µl
V _{gesamt}	70µl	70µl

Zwischen den Ansätzen wurden das PCR-Produkt und der Vektor mit dem QIAquick® PCR Purification Kit 50 von QIAGEN aufgereinigt.

37°C, über Nacht

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Aufreinigung von Plasmid DNA- und PCR Produktverdau

	hABCA3 WT cDNA	pEGFP-C1
DNA	30µl	30µl
10 x Buffer 4	7µl	7µl
Xho I	2µl ≈ 40U	2µl ≈ 40U
BSA	7µl	7µl
ddH ₂ O	24µl	24µl
V _{gesamt}	70µl	70µl

3.2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkt und Vektor mittels Crystal Violet Agarosegel-Elektrophorese

Crystal Violet ist ein Farbstoff der sich an die DNA anlagert. Er ermöglicht die Beobachtung des Verlaufs der Restriktionsfragmente während einer Elektrophorese ohne Zuhilfenahme von UV-Licht. Hierzu wurde einem 1%-Agarosegelgemisch vor dem Erkalten 80µl Crystal Violet (Ausgangskonzentration: 2mg/ml) zugesetzt. Nach Erkalten des Gels konnten die Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 130V über einen Zeitraum von 45min. Im Anschluss hieran war es möglich, die Restriktionsfragmente aus dem Gel zu schneiden und unter Verwendung des NucleoSpin®Extract II 50 - Kits aufzureinigen.

3.2.1.6 Dephosphorylierung des Vektors

Mithilfe der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) konnte das Phosphat am 5'-Ende des geöffneten pEGFP-C1-Vektors entfernt und somit eine Auto-Ligation des Vektors verhindert werden. 30 µl des 2-fach verdauten und aufgereinigten pEGFP-C1-Vektors wurden hierfür mit 2 µl SAP (1U/µl) und 5 µl des entsprechenden Puffers gemischt und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte die Reaktion durch Temperaturerhöhung auf 65°C gestoppt und der Reaktionsansatz mit dem NucleoSpin®Extract II 50 – Kit aufgereinigt werden.

3.2.1.7 Ligation von PCR-Produkt und Vektor

Die Ligation diente dem Einbau des PCR-Produkts in den durch den Restriktionsverdau geöffneten Vektor. Durch Verwendung von Xho I und Kpn I wiesen sowohl ABCA3 WT cDNA als auch pEGFP-C1 an ihren Enden komplementäre Überhänge von jeweils einem Strang des DNA-Doppelstrangs (sog. *sticky ends*) auf. Dies erleichterte die Ligation.

Die Reaktion wurde von der T4-Ligase (1U/µl) katalysiert. 2 µl des Enzyms wurden mit 2 µl des entsprechenden Puffers, dem PCR-Produkt und dem Vektor vermischt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an fehlerfrei klonierten Vektoren zu erhalten, erfolgte die Verwendung mehrerer Ansätze. Bei jedem Ansatz bestand ein anderes Verhältnis zwischen Vektor und PCR-Produkt: 1/2 : 1 1/2, 1 : 1, 1 : 3. Die Reaktionsansätze wurden für 2h bei 22°C inkubiert.

3.2.1.8 Identifikation und Isolierung fehlerfrei klonierter Plasmide

Im Anschluss an die Ligation wurden je 10 µl des Ansatzes in kompetente DH5α transformiert (siehe oben) und die E.coli Zellen auf Kanamycin-Agarplatten (50 µg/ml) aufgebracht. Auf diesen Platten konnten nur die Zellen wachsen, die einen intakten, zirkulären und somit ligierten Vektor aufgenommen hatten, da nur so das Kanamycinresistenzgen transkribiert werden konnte. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht. Am Folgetag konnten gewachsene Kolonien mit einer Pipettenspitze in kanamycinhaltiges LB-Medium überführt und die gewünschten Plasmide nach einer 8-stündigen Inkubation bei 37°C im Schüttelmixer mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit 50 isoliert werden. Die Überprüfung der Plasmidgröße mit und ohne Restriktionsverdau erfolgte erneut durch Agarosegelelektrophorese (Abbildung 11: Seite 52). Als Restriktionsenzyme dienten wiederum Kpn I und Xho I. Plasmide, welche die richtige Länge aufwiesen, wurden zur

Sequenzierung an Eurofins geschickt. Hiermit konnte die fehlerfreie Klonierung des GFP^N-ABCA3-WT-Vektors gesichert werden.

3.2.2 Zellkulturmethoden

3.2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Humane Typ II Lungenepithelzellen (A549) und HEK293-Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hierzu wurde RPMI-Medium, welches 10% FBS enthält, verwendet.

3.2.2.2 Auftauen von Zellen

Es erfolgte das Auftauen der in Cryotubes eingefrorenen Zellen im 37°C warmen Wasserbad sowie die anschließende Resuspension in 10ml vorgewärmtem Komplettmedium. Nach 24h erfolgte ein Wechsel des Mediums.

3.2.2.3 Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Um eine Kontaktinhibition zu verhindern, wurden die adhärenenten Zellen, sobald sie konfluent gewachsen waren, passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin/EDTA für 8min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch lösten sich die Zellen von der Kulturflasche. Die Proteaseaktivität konnte mit 8ml Komplettmedium inhibiert werden, bevor 9ml der Zellsuspension verworfen wurden. Zu den restlichen Zellen wurden 9ml frisches Komplettmedium gegeben.

3.2.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellen wurden zunächst, wie oben beschrieben, vom Boden der T₇₅-Flasche gelöst. Anschließend erfolgte das Aufbringen von 10µl der Zellsuspension auf eine Zählkammer nach Neubauer und Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop. Das Raster der Zählkammer bestand aus neun Quadraten. Die Quadrate an den Ecken der Kammer wiesen ein Volumen von 10⁻⁴ml auf und waren jeweils wiederum in 16 Einzel-Quadrate unterteilt. Die Zellen wurden in jedem der vier Eckquadrate gezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl/µl zu errechnen.

Um sicherzustellen, dass nur vitale Zellen berücksichtigt werden, kann der Zellsuspension vor dem Zählen 0,4 %-ige Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 zugesetzt werden. Dies führt zur Aufnahme von Trypanblau in Zellen mit geschädigter Zellmembran. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop folglich blau, während der Farbstoff von vitalen Zellen nicht absorbiert wird. Allerdings ist nun bei der Bestimmung der Zellzahl darauf zu achten, den Verdünnungsfaktor miteinzurechnen.

3.2.2.5 Einfrieren von Zellen

Die adhärent gewachsenen Zellen wurden, wie oben beschrieben, trypsinisiert, das Trypsin jedoch zunächst abgesaugt, bevor die Zellen in Einfriermedium resuspendiert werden konnten. Dieses bestand aus 50% FBS, 10% DMSO und 40% Komplettmedium. Im Anschluss hieran konnten die Zellen in Cryotubes überführt werden, welche in einer speziellen Einfrierbox, die Isopropanol enthielt, bei -80°C tiefgefroren wurden. Die Box gewährleistete einen gleichmäßigen Temperaturabfall von 1°C/min. Nach 90min konnten die Cryotubes in den -195°C kalten Stickstofftank überführt werden. Hier erfolgte die Langzeitlagerung der Zellen.

3.2.2.6 Transiente Transfektion von A549-Zellen

Die Transfektion erfolgte mittels ExGen 500. Hierbei handelt es sich um ein Reagenz, welches mit DNA zu stabilen Komplexen reagiert. Die Eigenschaften von ExGen500 erleichtern die Diffusion dieser Komplexe, welche sich an die Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose aufgenommen werden. Im Anschluss an die Aufnahme führt ExGen500 innerhalb der Endosomen zu einer Pufferung des pH-Wertes. Dies erleichtert die Ruptur der Endosomen. Die DNA kann nun in den Zellkern transloziert werden. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Methode dargestellt. Die Mengenangaben beziehen sich hierbei auf ein Well einer 6-Well-Platte, welches neben den Zellen 2ml Komplettmedium enthält.

3µg des zu transfizierenden Plasmids wurden mit 200µl isotoner NaCl-Lösung vermischt und herunterzentrifugiert. Anschließend wurden diesem Ansatz 9,87µl ExGen500 zugesetzt und das Gemisch sofort im Anschluss hieran für 10sec gevortext, bevor es für 10min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss an die Inkubation konnten die somit

erhaltenen DNA-Ex-Gen-Komplexe auf die Zellen pipettiert werden. Nach 24-48h im Brutschrank war ein Maximum der Transfektionsrate erreicht.

3.2.2.7 Behandlung stabil transfizierter A549 Zellen mit Antibiotika und Proteaseinhibitoren

Stabil transfizierte Zellen wurden zunächst trypsinisiert und gezählt. Anschließend konnten je 250.000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte überführt werden, welches bereits 2ml vorgewärmtes Kompletmedium enthielt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank waren die Zellen zu etwa 90% konfluent gewachsen und konnten nun mit dem gewünschten Antibiotikum oder Proteaseinhibitor behandelt werden. Es wurden stets fünf 6-Well-Platten verwendet, wobei eine Platte unbehandelt blieb. Auf die anderen Zellen wurde das gewünschte Medikament entweder 1h, 5h, 18h oder 24h vor der Herstellung von Zell-Lysaten pipettiert. Zu beachten war hierbei die für jedes Medikament unterschiedliche benötigte Konzentration. Diese konnte durch Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu testenden Medikaments über Nacht und anschließender Effektüberprüfung mittels Western Blot (siehe unten) ermittelt werden: Brefeldin A: 10µg/ml, Monensin Sodium: 4µM, Bafilomycin A1: 0,4µM, Pepstatin: 1 - 100µM, E64: 1 -100µM. Die stabil transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von Eva Kaltenborn zur Verfügung gestellt.

3.2.2.8 Herstellung von Zell-Lysaten

Die in 6-Well-Platten gewachsenen Zellen (HEK 293 bzw. A549) konnten nach Absaugung des Mediums mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert (200µl Trypsin-EDTA/Well) werden. Es folgte eine Inkubation für 10min bei 37°C, bevor die Reaktion durch Zugabe von 400µl Kompletmedium gestoppt und die Zellen im Anschluss hieran in 1,5ml Eppendorftubes (2 Well/Tube) überführt wurden. Als nächster Schritt erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 5min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut mit PBS gewaschen, um das restliche Trypsin-EDTA zu entfernen. Im Anschluss hieran erfolgte die erneute Zentrifugation bei 300 x g für 5min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 140µl RIPA-Puffer, welcher 4% Proteinase-Inhibitor enthielt, resuspendiert. Das Zellgemisch musste nun

für 15min auf Eis inkubiert werden. In dieser Zeit bewirkte der RIPA-Puffer die Lyse der Zellen. Um den Effekt noch zu verstärken, wurden die Zellen im Anschluss hieran für 18sec sonifiziert und schließlich erneut für 15min auf Eis inkubiert. Erst dann erfolgte die Zentrifugation bei 1000 x g für 30min bei 4°C. Das hierdurch entstandene Pellet enthielt die noch verbleibenden Zellbruchstücke, während im Überstand die Proteine enthalten waren. Der Überstand wurde folglich in ein steriles Tube überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt.

3.2.2.9 Membranisolierung

Die erneut in 6-Well-Platten konfluent gewachsenen HEK 293 Zellen konnten nach Waschen mit PBS mit 1ml eiskaltem Homogenization Buffer A behandelt und anschließend von den Plattenböden abgeschabt werden. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen erneut in 1ml Homogenization Buffer A resuspendiert und im Anschluss hieran durch Pottern auf Eis und 40-sekündige Sonifizierung aufgebrochen. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 700 x g bei 4°C für 10min. Der hierdurch gewonnene Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge mit 100.000 x g bei 4°C für eine weitere Stunde zentrifugiert. Das somit entstandene Pellet enthielt die Membranen der Zelle und wurde nach Abpipettieren des Überstandes in 40µl Resuspension Buffer B resuspendiert. Die enthaltene Proteinkonzentration konnte ebenfalls mittels Bradford-Assay bestimmt werden.

3.2.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford et al. [83]. Diese beruht auf der photometrischen Messung der Lichtabsorption der Proben bei 600nm. Als Proteinfarbstoff diente das Bio-Rad-Reagenz, welches vor der Verwendung im Verhältnis 1:5 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und danach filtriert werden musste. Zu 100µl dieser Verdünnung wurden 1µl der zu messenden Probe pipettiert. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung und berücksichtigte den Blindwert (100µl des verdünnten Bio-Rad Reagenz + 5µl PBS). Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in PBS-Puffer verwendet (5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml,

78,15 µg/ml). Vom Standard wurden jeweils 5µl benötigt, weshalb das gemessene Ergebnis der Proben mit dem Faktor 5 multipliziert werden musste.

3.2.4 Proteindeglykosylierung

Zu den Membranproteinen, welche mittels Membranisolierung gewonnen worden waren, zählte auch ABCA3, weshalb die Membransuspension zur Deglykosylierung von ABCA3 genutzt werden konnte. Hierfür wurden 5µg Membranprotein zunächst mit 1µl Glycoprotein Denaturation Buffer für 10min bei 100°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Deglykosylierung mit PNGase F, bzw. Endo H in getrennten Ansätzen unter Verwendung der entsprechenden Puffer (G7R-Buffer für PNGase F, G5R-Buffer für Endo H). Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass bei Verwendung des Enzyms Endo H lediglich Mannose-haltige Oligosaccharide von ABCA3 abgespalten werden, während PNGase F zu einer vollständigen Deglykosylierung von ABCA3 führt, da es sowohl Mannose-haltige Oligosaccharide als auch komplexe Zuckermoleküle von ABCA3 entfernt. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die anschließende Auswertung erfolgte mittels Western Blot.

3.2.5 Immunologische Methoden

3.2.5.1 Western Blot

Mithilfe des Western Blots können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und die einzelnen Proteinbanden auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde zunächst eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt. Dies erforderte zu Beginn die Aufbereitung der Proben. Als Ausgangsmaterial dienten Zell-Lysate, deren Proteinkonzentrationen bestimmt worden waren. 30-40µg Protein wurden mit 4 x LDS und 10% DTT versetzt und für 10min bei 70°C inkubiert. DTT ist aufgrund seiner stark reduzierenden Eigenschaft dazu in der Lage Disulfidbrücken zu spalten und somit die sekundären und tertiären Strukturen der Proteine aufzulösen. Die Proteine lagen nun folglich in ihrer denaturierten Form vor. LDS diente nicht nur als Puffer, es enthielt zusätzlich Coomassie-Farbstoff, welcher die Proteine anfärbte und es somit ermöglichte den Fortschritt der Elektrophorese zu beobachten.

Die so präparierten Proben wurden nun in die Taschen eines 3-8% Tris-Acetat-Gels pipettiert. Um eine genaue Aussage über das Molekulargewicht der einzelnen Proteine treffen zu

können, wurde zusätzlich der Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard aufgetragen. Als Puffer diente 1-facher Tris-Acetat-Puffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 150V über eine Dauer von ca. 90min, wobei das SDS im Gel eine negative Proteinladung bewirkte und sich die Proteine somit in Richtung der positiv geladenen Anode bewegten. Da kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern konnten als größere, wurden die Proteine auf diese Weise nach ihrer Größe aufgetrennt.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde eine zuvor für 1min in Methanol inkubierte Nitrocellulosemembran auf das Gel aufgebracht. Die Proteinübertragung erfolgte im *SemiDry*-Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Moduls bei 220mA in Transfer-Puffer innerhalb von 120min.

Anschließend wurde die Membran für 1h mit Blocking-Puffer inkubiert, welcher aus 5% Magermilchpulver und TBS-T bestand. Dies war nötig, um eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen zu erreichen. Im Anschluss hieran konnte die Membran geschnitten und die einzelnen Anteile mit dem jeweils gewünschten Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte wiederum in Blocking-Puffer und kann der Tabelle 8 entnommen werden. Bevor die entsprechenden Sekundärantikörper-Verdünnungen aufgebracht werden konnten, musste die Membran zunächst 4 x für je 15min mit TBS-T gewaschen werden. Auch die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper erfolgte über 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 4 x für 5min mit TBS-T und einmal mit Wasser gewaschen und danach mit ECL Chemilumineszenzlösung aktiviert. Der letzte Schritt war die Entwicklung der Membran auf einem Röntgenfilm. Die Bandenintensität wurde mit der Software Aida von Raytest ausgewertet.

Tabelle 8: Verwendete Western Blot Antikörper und das jeweilige Zielprotein

Protein	Primär-Antikörper und Verdünnung	Sekundär-Antikörper und Verdünnung
ABCA 3 (HA-Taq)	HA (High Affinity)-Taq 1:1000	Rat IgG – HRP conjugate 1:10 000
ABCA3 (GFP-Taq)	GFP-Taq 1:1000	Mouse-IgG - HRP conjugate: 10ml der gebrauchsfertigen Lösung
Beta Actin	β-Actin – HRP conjugate 1:10 000	Kein Sekundär-Antikörper erforderlich

3.2.5.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz ermöglicht eine differenzierte Darstellung von Zellbestandteilen mittels Antikörpern. Der Primärantikörper bindet hierbei an spezifische Zellantigene (Epitope), während sich der Sekundärantikörper an den Primärantikörper heftet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und löst durch eine Enzym-Substratreaktion die Farbentstehung aus, welche zur Markierung einzelner Proteine und Zellbestandteile führt. Mithilfe der Ko-Lokalisation ist es dadurch möglich, Proteine den einzelnen Zellkompartimenten zuzuordnen.

Zu Beginn wurden Zellen auf Coverslips in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum transient transfiziert. Nach weiteren 48h erfolgte die Fixierung der Zellen. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss hieran erfolgte die eigentliche Fixierung mit -20°C kaltem Methanol für 10 min. Methanol führte zudem zu einer Permeabilisierung der Zellen, was das spätere Eindringen der Antikörper in die Zellen ermöglichte. Zur Entfernung des Methanols wurden die Zellen anschließend 3 x mit PBS gewaschen, bevor unspezifische Bindungsstellen bei Raumtemperatur blockiert werden konnten. Die Inkubationszeit des Blockpuffers betrug 30min. Er bestand aus 3% BSA und 10% FBS in PBS. Anschließend konnte der Primärantikörper auf die Zellen aufgebracht werden. Die Verdünnung erfolgt in Blockpuffer und ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen 3 x für je 5min mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper zur Anwendung kam. Dieser wurde ebenfalls mit Blockpuffer verdünnt (siehe Tabelle 9). Nach einer Inkubationszeit von einer weiteren Stunde wurden die Zellen 13 x mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen. Um ein schnelles Ausbleichen unter dem Fluoreszenzmedium zu verhindern, wurden die Zellen anschließend mit Vectashield Mounting Medium behandelt und die Coverslips auf Objekträger aufgebracht. Vectashield Mounting Medium härtet beim Trocknen aus und erleichtert somit die Handhabung der Präparate. Zudem enthält es DAPI (4,6'diamidino-2-phenylindole), welches die Zellkerne blau anfärbt. Nach einer Trockenzeit von 15 min konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur Immunfluoreszenz und jeweilige Zielstrukturen

Zelluläre Zielstruktur	Primärantikörper	Verdünnung PrimärAK	Sekundärantikörper
Lamellar-Körperchen	Mouse anti-Lamp3	1:200	Goat-anti-mouse Alexa Fluor 555
Endopl. Retikulum	Rabbit-anti-Calnexin	1:200	Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 555
ABCA3-HA-Taq	Rat-anti-HA	1:200	Donkey-anti-Rat Alexa 488
GFP/YFP	Kein Antikörper benötigt, da Protein von selbst fluoresziert		

3.2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA-One-Way Test und dem Bonferroni-Test. Sofern nicht anders angegeben, liegen den statistischen Ergebnissen mindestens drei unabhängige Experimente zugrunde. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (S.E.M.). Die graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0.

4 Ergebnisse

4.1 WT-Prozessierung von ABCA3

Um die Entstehung von Atemnotsyndrom und ILD durch ABCA3 Mutationen besser zu verstehen und mögliche Therapieansatzpunkte zu identifizieren, ist es zunächst nötig, genauere Erkenntnisse über die Prozessierung von WT ABCA3 zu erlangen.

4.1.1 Die 150kDa große Form von WT-ABCA3 wird in stabil transfizierten A549-Zellen stärker exprimiert als in transient transfizierten Zellen

Um einen Vergleich zwischen stabil und transient transfizierten A549 Zellen zu ermöglichen, wurden unbehandelte A549 Zellen zunächst in 6-Well Platten ausgesät. Nach 24h erfolgte die transiente Transfektion mit dem pub6-hABCA3-WT-HA^C-Plasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nina Weichert). Dieser Vektor führte zur Expression eines C-terminal mit HA (1kDa) markierten ABCA3-Proteins. 48h nach der Transfektion war von einer maximalen Expressionssrate auszugehen und die Zellen konnten zur Bildung von Zell-Lysaten verwendet werden, welche als Ausgangsmaterial zur Durchführung eines Western Blots dienten. Der Immunoblot erfolgte unter Verwendung eines Anti-HA-Antikörpers und resultierte in der Darstellung von zwei Proteinbanden auf dem entwickelten Film. Die obere Bande wies eine Größe von 190kDa auf, während die Größe der unteren Bande 150kDa betrug (Abbildung 10, rechte Säule). Im nächsten Schritt wurde ein weiterer Immunoblot, diesmal mit stabil transfizierten Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eva Kaltenborn) durchgeführt. Zur stabilen Transfektion war ebenfalls der pub6-hABCA3-WT-HA^C-Plasmid verwendet worden, weshalb ABCA3 erneut mit Anti-HA-Antikörper detektiert werden konnte. Auch hier zeigten sich zwei Banden mit der Größe von 190 und 150kDa (Abbildung 10, linke Säule).

Allerdings fiel ein Unterschied im Verhältnis der beiden Banden zueinander auf. Der Immunoblot, bei dem transient exprimiertes ABCA3 zur Darstellung kam, zeigte eine deutlich stärkere obere, 190kDa große Bande, im Vergleich zur schwächer ausgeprägten unteren, 150kDa großen Bande. Der mit stabil transfizierten Zellen durchgeführte Immunoblot wies hingegen ein umgekehrtes Bild auf. Hier war die untere Bande deutlich kräftiger ausgebildet. Davon ausgehend, dass stabil transfizierten Zellen ein längerer Zeitraum zur Proteinbildung und Prozessierung zur Verfügung steht als transient transfizierten Zellen und sie somit vermutlich mehr reifes Protein als unreife Vorstufen enthalten, wurde folgende Hypothese

aufgestellt: Bei der unteren, 150kDa großen Bande handelt es sich um die reife Form von ABCA3, während es sich bei der oberen, 190kDa großen Bande um die unreife Vorstufe des ABCA3-Proteins handelt.

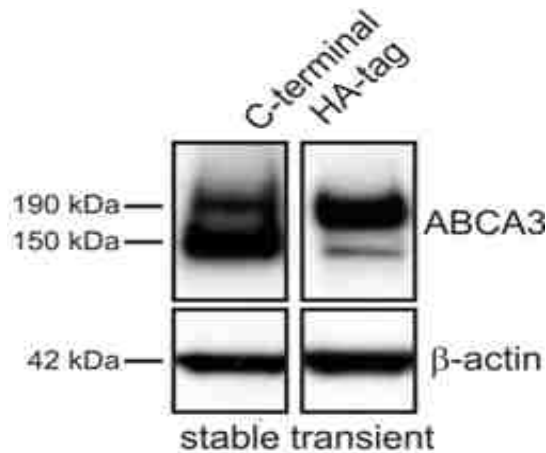


Abbildung 10: Vergleich zwischen transient und stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Plasmid transfizierten Zellen im Western Blot

In Zelllysaten wurde WT-ABCA3 mittels HA-Taq im Western Blot, sowohl in stabil als auch in transient transfizierten Zellen detektiert. Es zeigt sich eine deutlich stärkere Ausprägung der 150kDa großen Bande in den stabil transfizierten Zellen gegenüber den transient transfizierten Zellen. In Bezug auf Beta-Aktin ist kein Unterschied nachweisbar.

Eine mögliche Erklärung für die Größendifferenz von 40kDa (entspricht ≈ 364 AS) zwischen der oberen und unteren Bande kann eine vermutete proteolytische Spaltung im Lauf der Prozessierung von ABCA3 sein. Da bei den durchgeführten Immunoblots C-terminal markiertes ABCA3 Verwendung fand, ist davon auszugehen, dass die Spaltung nicht am C-Terminus erfolgt. Wäre dies der Fall, hätte die untere, kleinere Bande im Immunoblot nicht zur Darstellung kommen können, da es bei C-terminaler Prozessierung zur Abspaltung des HA-Markers gekommen wäre. Deshalb ist davon auszugehen, dass WT ABCA3 im Lauf der Prozessierung N-terminal proteolytisch gespalten wird.

Um diese Hypothese zu bestätigen, war es nötig, einen Vektor zu klonieren, der zur Expression eines N-terminal markierten ABCA3-WT-Proteins führte.

4.1.2 Der neu erstellte GFP^N-ABCA3-WT-Vektor kann zur Transfektion von A549 Zellen verwendet werden

Zur Herstellung des GFP^N-ABCA3-WT-Plasmids wurde hABCA3 pcDNA3 (5115bp) in einen pEGFP-C1-Vektor (4,7kb) kloniert und in E.coli transformiert. Da der fehlerfrei

klonierte GFP^N-ABCA3-WT-Plasmid bei den transformierten Zellen zur Ausbildung einer Kanamycinresistenz führte, konnten diese Zellen im Gegensatz zu nicht transformierten Zellen auf Kanamycin-Agarplatten wachsen und somit identifiziert werden. Die gewünschten Kolonien konnten nun in LB-Medium vermehrt werden. Anschließend folgte die Plasmidisolierung mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit 50. Um zu bestätigen, dass die Klonierung erfolgreich war, wurden die isolierten Plasmide mit den zuvor für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen (Xho I, Kpn I) geschnitten und mithilfe der Agarosegel-Elektrophorese auf die richtige Größe hin untersucht. Die spezifischen Restriktionsstellen von Xho I und Kpn I hatten zuvor im Prozess der Klonierung als Ausgangspunkt für die Ligation zwischen hABCA3 cDNA und pEGFP-C1-Vektor gedient. Somit führte der Verdau des klonierten Vektors mit diesen Enzymen in der DNA-Elektrophorese zur Ausbildung von genau zwei Banden (Abbildung 11). Diese Banden entsprachen zum einen dem PCR-Produkt (hABCA3 pcDNA 3 (5141bp) und zum anderen dem pEGFP-C1-Vektor (4,7kb) abzüglich des ca. 25bp langen Restriktionsfragments, welches im Rahmen des Klonierungsprozesses aus dem pEGFP-C1-Plasmid herausgeschnitten worden war.

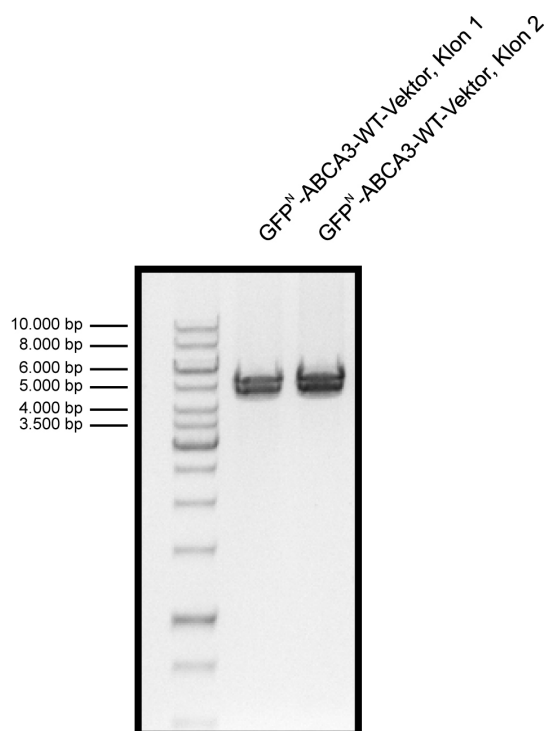


Abbildung 11: Kontrolle des fertigen GFP^N-ABCA3-WT-Vektors mittels Agarosegel-Elektrophorese

Nach Restriktionsverdau mit Kpn I und Xho I sind in der Elektrophorese bei beiden isolierten Klonen je zwei Banden der zu erwartenden Länge (4698bp und 5141bp) nachweisbar. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Klonierung des GFP^N-ABCA3-WT-Vektors erfolgreich war.

Die richtige Größe des GFP^N-ABCA3-WT-Plasmids konnte hiermit bestätigt werden. Um auch eine etwaige fehlerhafte Basenpaarabfolge ausschließen zu können, wurden die per Elektrophorese bestätigten Klone zur Sequenzierung an Eurofins geschickt. Die Ergebnisse zeigten eine fehlerfreie Basenpaarabfolge und bestätigten die Vollständigkeit der einzelnen Klone. Der GFP^N-ABCA3-WT-Vektor konnte somit für die Transfektion von A549-Zellen verwendet werden.

4.1.3 Der N-Terminus ist bei der 150/180kDa großen Form von WT-ABCA3 abgespalten

Die Expression von N-terminal markierten ABCA3 erforderte die Transfektion von A549-Zellen mit dem GFP^N-ABCA3-WT-Vektor. Hierfür wurden die Zellen zunächst in 6-Well-Platten ausgesät und 24h später mittels ExGen500 transfiziert. Um einen Vergleich zwischen N- und C-terminal markiertem ABCA3 anstellen zu können, wurde nur bei einem Teil der Zellen der GFP^N-ABCA3-WT-Vektor verwendet. Der andere Teil wurde mit GFPC-ABCA3-WT-Vektor behandelt. 48h nach der Transfektion wurden erneut Zell-Lysate gebildet und ein Western Blot durchgeführt. Der Immunoblot erfolgte hierbei mit dem Western Breeze®-Kit von Invitrogen. Dieses enthielt unter anderem einen Primärantikörper gegen YFP/GFP. Die Expression von C-terminal mit GFP markierten ABCA3 führte im Immunoblot zur Ausbildung von zwei Banden, wie es zuvor schon für HA markiertes ABCA3 gezeigt werden konnte. Der einzige Unterschied bestand in der Größe der Banden, da der YFP/GFP-Marker mit 30kDa größer ist als der 1kDa große HA-Marker. Somit wies die obere Bande in diesem Fall eine Größe von 220kDa und die untere Bande eine Größe von 180kDa auf (Abbildung 12, links, 1.Säule).

Die Expression von N-terminal mit GFP markierten ABCA3 zeigte ein anderes Bild. Der Immunoblot mit dem GFP-Antikörper resultierte in der Ausbildung nur einer Bande (Abbildung 12, links 2. und 3. Säule). Hierbei handelte es sich um die größere, obere Bande. Die 180kDa Form von ABCA3 war in diesem Fall nicht nachweisbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass der kleinen Form von ABCA3 tatsächlich der N-Terminus und somit auch der Marker fehlte. Dies unterstützte die Hypothese, dass es sich bei der oberen 220kDa großen

Bande um die unreife Vorstufe von ABCA3 handelt, welche im Lauf der Prozessierung N-terminal proteolytisch gespalten wird.

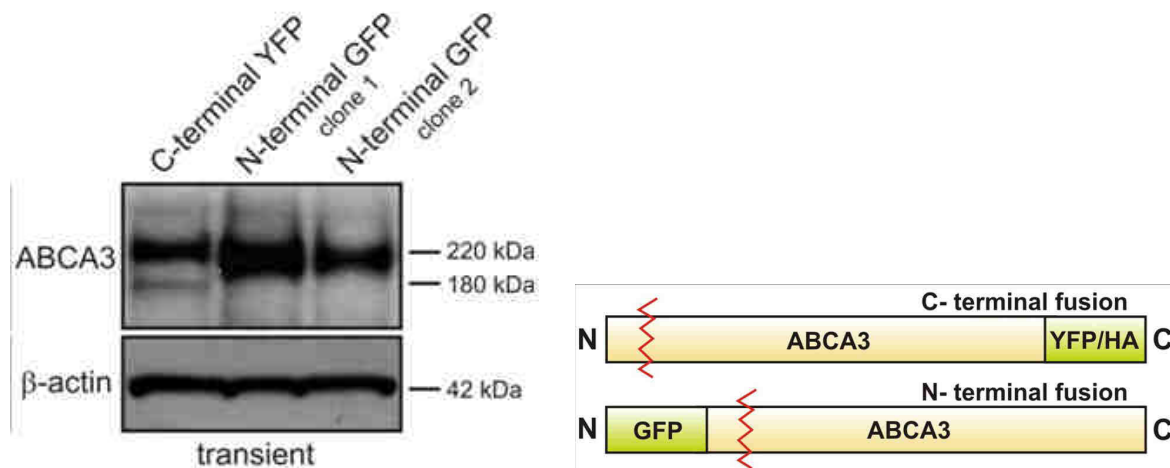


Abbildung 12: Western Blot mit C-sowie N-terminal markiertem WT-ABCA3

Auf der rechten Seite ist schematisch das C- bzw. N-terminal markierte ABCA3-WT Protein, sowie die propagierte N-terminale proteolytische Spaltung dargestellt. Links kommt der Western Blot aus Zelllysaten mit C- und N-terminal markiertem WT-ABCA3 zur Darstellung. Hierbei fällt auf, dass im Falle des N-terminal markierten Proteins (2. und 3. Säule) nur die obere 220kDa große Bande nachweisbar ist, während beim C-terminal markierten ABCA3 zudem eine 180kDa große Form auftritt. Somit ist davon auszugehen, dass der N-Terminus (und somit der Marker) bei der 180kDa Form abgespalten wurde. Zusätzlich Nachweis von Beta-Aktin: Haushaltsprotein

4.1.4 Die vollständige Deglykosylierung von WT ABCA3 führt zu einer Reduktion der Proteingröße um 10kDa

Um zu zeigen, dass es sich bei der 150/180kDa großen Form von WT-ABCA3 (Größe abhängig vom verwendeten Marker) nicht lediglich um das vollständig deglykosylierte Protein handelt, wurde WT-ABCA3 zunächst mithilfe von Membranisolierung aus mit dem pub6-hABCA3-WT-HA^C-Vektor transient transfizierten HEK 293 Zellen gewonnen. Anschließend erfolgte die Deglykosylierung des WT-ABCA3-Proteins mit den Enzymen EndoH, bzw. PNGase F. Während unter Verwendung des Enzyms Endo H lediglich Mannose-haltige Oligosaccharide von ABCA3 abgespalten werden können, führt PNGase F zu einer vollständigen Deglykosylierung von ABCA3, da es sowohl Mannose-haltige

Oligosaccharide als auch komplexe Zuckermoleküle von ABCA3 entfernt [20]. Die Auswertung der Enzymbehandlung erfolgte erneut mit Western Blot unter Verwendung des HA-Antikörpers. Hierbei zeigte sich, dass WT-ABCA3 im Falle einer vollständigen Deglykosylierung mit PNGase weiter in Form von zwei Banden zur Darstellung kam. Allerdings wies die obere Bande lediglich eine Größe von 180 statt 190kDa auf. Die untere Bande kam unverändert mit 150kDa zur Darstellung (Abbildung 13, zweite Säule). Die vollständige Deglykosylierung von WT-ABCA3 führt folglich lediglich zur Ausbildung eines 10 kDa kleineren Proteins.

Im Falle der Endo H Behandlung waren drei Banden mit je einer Größe von 190kDa, 180kDa und 150kDa nachweisbar (Abbildung 13, dritte Säule).

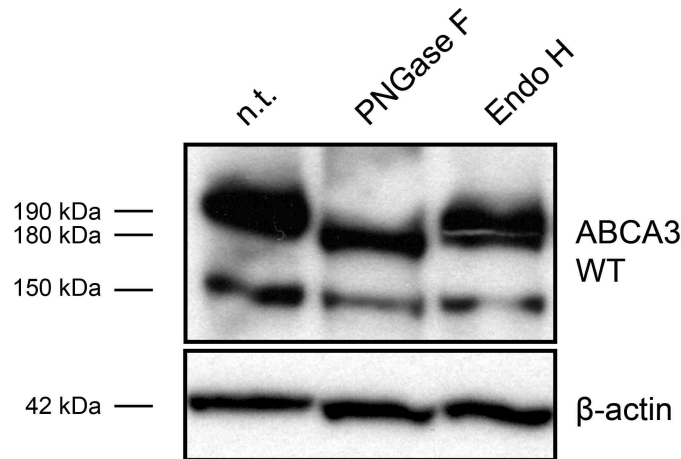


Abbildung 13: Auswirkung der Deglykosylierung von WT-ABCA3 im Western Blot

Mittels Membranisolierung aus HEK 293 Zellen gewonnens WT-ABCA3 wurde mittels HA-Taq im Western Blot detektiert, nachdem es entweder nicht (n.t.), mit PNGaseF, oder EndoH deglykosyliert worden war. Im Falle der vollständigen Deglykosylierung mittels PNGaseF zeigt sich eine Reduktion der Proteingröße um 10kDa.

4.1.5 Die proteolytische Spaltung von ABCA3 erfolgt innerhalb der Lamellarkörperchen

Um zu bestätigen, dass es sich bei der unteren 150/180kDa großen Bande um die reife Form von ABCA3 handelt, welche durch N-terminale proteolytische Spaltung aus der 190/220kDa Form hervorgeht, musste zunächst der Ort dieses Prozesses identifiziert werden. Hierfür wurde die Prozessierung von ABCA3 mithilfe von Antibiotika (Brefeldin A (BrefA),

Monensin Sodium (Mon) und Bafilomycin A1 (BafA)) an unterschiedlichen Punkten innerhalb der Zelle unterbrochen (Abbildung 14).

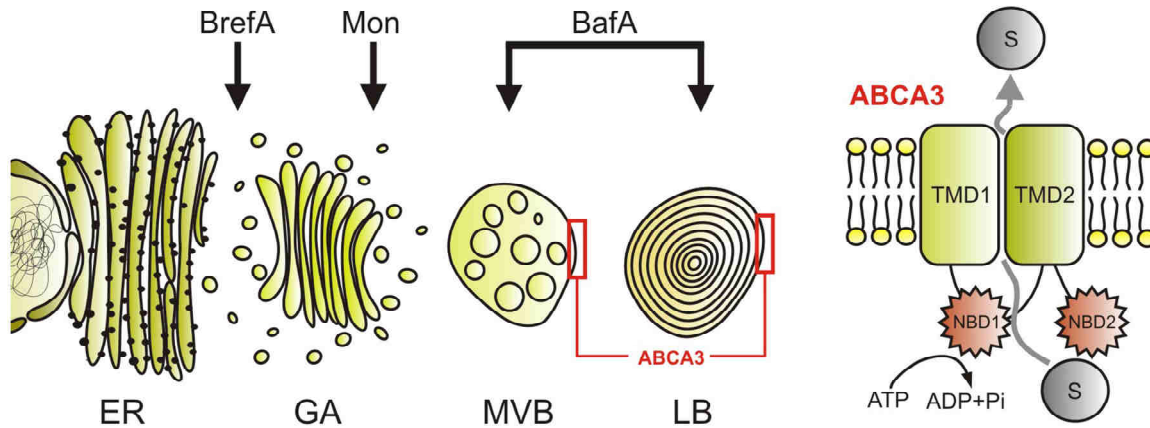


Abbildung 14: Schematische Darstellung der ABCA3-Prozessierung und Angriffsorte der verwendeten Antibiotika

Der Grafik sind die einzelnen Punkte zu entnehmen, an welchen die Prozessierung von WT-ABCA3 durch die Antibiotika Brefeldin A (BrefA), Monensin Sodium (Mon) und Bafilomycin A1 (BafA) unterbrochen wird.

Bei den hierfür verwendeten A549-Zellen handelte es sich um die mit dem pub6-hABCA3-WT-HA^C-Vektor stabil transfizierten Zellen, die zum Wachstum jeweils auf fünf 6-Well-Platten verteilt wurden. Nach ca. 24h konnte mit dem Einsatz der Antibiotika begonnen werden, wobei immer eine der Platten unbehandelt blieb. Von den verbleibenden vier 6-Well-Platten wurde je eine Platte für 1h, 5h, 18h und 24h (nicht im Fall von Brefeldin A) mit dem jeweiligen Medikament inkubiert. Bei der Wahl der Medikamenten-Konzentration (Brefeldin A: 10µg/ml, Monensin Sodium: 4µM, Bafilomycin A1: 0,4µM) wurde darauf geachtet, dass das allgemeine Zellwachstum nicht behindert wurde. Im Folgenden wird die Auswirkung der einzelnen Antibiotika auf die Prozessierung von WT ABCA3 dargestellt.

Brefeldin A führt zu einer Unterbrechung des Proteintransports zwischen ER und Golgi [36, Abbildung 14], was eine Proteinakkumulation im ER zur Folge hat. Im Anschluss an die Brefeldin A-Behandlung erfolgte die Zellernte. Die Auswertung des mit den Zell-Lysaten unter Verwendung des anti-HA-Antikörper durchgeführten Immunoblots (Abbildung 15, links) zeigte bei den mit Brefeldin A behandelten Zellen eine deutliche Akkumulation der 190 kDa Form von ABCA3 im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Die obere Bande war umso kräftiger ausgeprägt, je länger die Zellen mit Brefeldin A inkubiert worden waren.

Gleichzeitig zeigte sich bei ansteigender Behandlungszeit eine deutliche Abschwächung der 150kDa Bande. Dies beweist zum einen, dass es sich bei dem 150kDa großen Protein um die reife Form von ABCA3 handelt, welche durch die Abspaltung des N-Terminus aus der 190kDa Vorstufe hervorgeht. Zum anderen wird deutlich, dass dieser Prozess nicht im ER erfolgen kann. Wäre dies der Fall, dann hätte Brefeldin A keine Auswirkung auf die N-terminale Prozessierung von ABCA3 haben können, da es die ABCA3-Prozessierung ja erst nach Passage des ER unterbricht und das 190kDa große Protein wäre trotz Behandlung nicht akkumuliert.

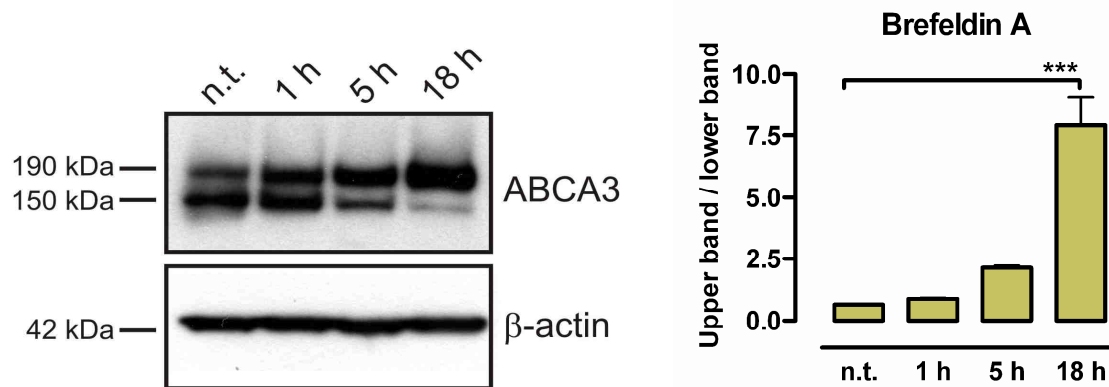


Abbildung 15: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Brefeldin A-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigt sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von WT-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$).

Monensin blockiert den trans-Golgi-Transport und führt somit zu einer Proteinakkumulation im Golgi-Apparat [36, 37]. Die Beurteilung des Effekts der Prozessierungsunterbrechung durch Monensin erfolgte ebenfalls im Immunoblotverfahren. Es zeigte sich dasselbe Bild wie bereits bei der Verwendung von Brefeldin A. Je länger die Zellen mit Monensin behandelt worden waren, desto stärker akkumulierte die 190kDa Form von ABCA3 und desto schwächer ausgeprägt war die untere Bande (Abbildung 16, links). Dies sprach dafür, dass die proteolytische Spaltung von ABCA3 im oder nach dem Trans-Golgi-Netzwerk erfolgen muss.

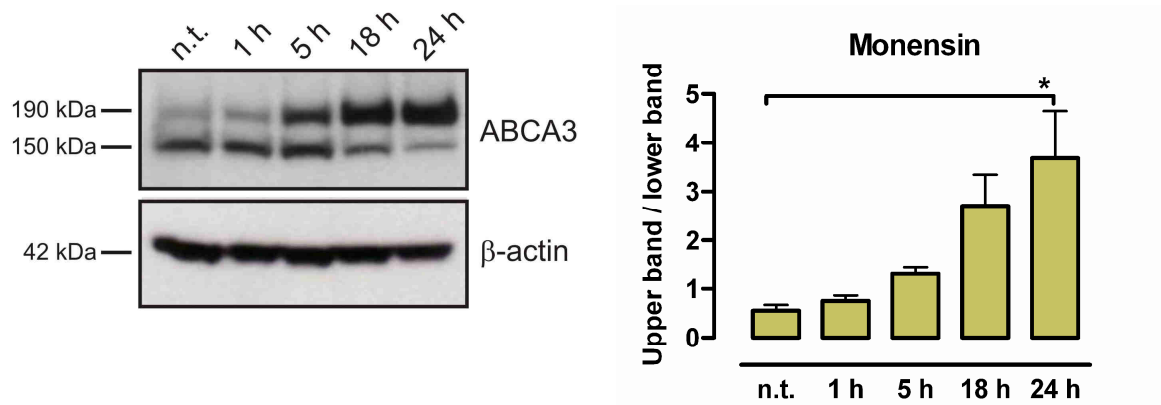


Abbildung 16: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Monensin und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Monensin-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigt sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von WT-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$).

Um den Ort weiter eingzugrenzen zu können, kam im nächsten Schritt Bafilomycin A1 zur Anwendung. Bafilomycin A1 inhibiert eine ATPase die für die Ansäuerung und somit auch für die Funktion von sekretorischen Organellen benötigt wird [38, 39]. Zu diesen Organellen zählen auch die Zielstrukturen von ABCA3, die sogenannten MVBs und LBs. Die Verwendung von Bafilomycin A1 führte folglich erst auf Höhe dieser Strukturen zu einer Unterbrechung der ABCA3-Prozessierung. Alle Schritte, die vor der Erreichung des finalen Zielortes von ABCA3 abliefen, blieben unbeeinflusst. Dennoch führte auch der Einsatz von Bafilomycin A1 zu einer Blockierung der N-terminalen proteolytischen Spaltung des 190 kDa großen ABCA3-Proteins, was wiederum im Western Blot an einer Verbreiterung der oberen und Abnahme der unteren Bande im Lauf ansteigender Behandlungszeiten zu erkennen war (Abbildung 17, links). Da es sich bei den MVBs und LBs, wie bereits oben erwähnt, um die endgültigen Zielorganellen von ABCA3 handelt, kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass die N-terminale proteolytische Spaltung der ABCA3-Vorstufe innerhalb dieser Strukturen erfolgen muss.

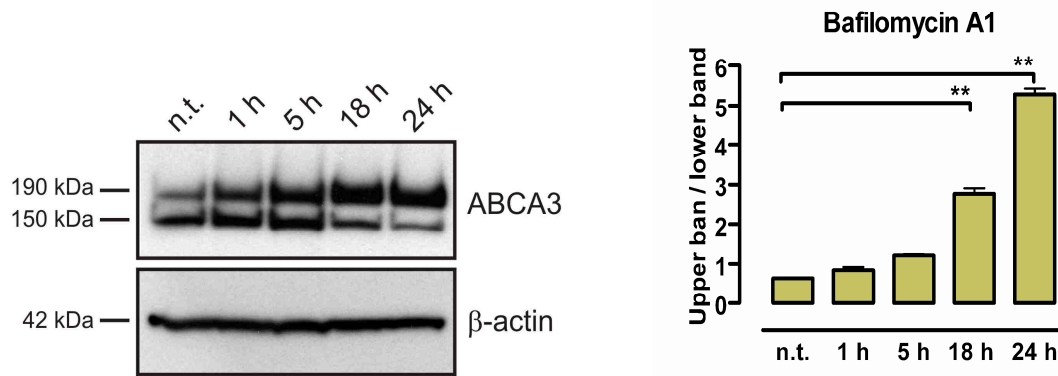


Abbildung 17: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Bafilomycin A1 und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Bafilomycin-A1-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigt sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von WT-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,01$).

4.1.6 Der N-terminale Marker von WT-ABCA3 kann in LAMP3 positiven Vesikeln nachgewiesen werden

Die bisherigen Experimente hatten gezeigt, dass das 150/180kDa große ABCA3-Protein durch Abspaltung des N-Terminus aus der 190/220 großen Vorstufe hervorgeht und dieser Prozess innerhalb der MVBs und LBs stattfindet. Dies bedeutete, dass es möglich sein musste, den N-terminalen Marker von ABCA3 in MVBs und LBs nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde als nächstes eine Immunfluoreszenz mit N-terminal markiertem ABCA3 durchgeführt. Hierfür wurden A549-Zellen auf Coverslips ausgesät und nach 48h transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung von ExGen500. Um einen Vergleich von C-terminal mit N-terminal markierten ABCA3 zu ermöglichen, wurde ein Teil der Zellen mit dem GFP^N-ABCA3-WT-Vektor transfiziert, während bei einem anderen Teil der YFP^C-ABCA3-WT-Vektor verwendet wurde. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion für die Immunfluoreszenz fixiert. Anschließend erfolgte die Markierung von ER, MVBs und LBs mittels Antikörpern. Für die Darstellung des ERs wurde als Primärantikörper der Rabbit-anti-Calnexin-Antikörper gewählt. Calnexin ist ein Integralprotein des ER, fungiert als Chaperon und ist für das ER spezifisch. Die Markierung von MVBs und LBs erfolgte mit dem Mouse-anti-Lamp3-Antikörper. Lamp3 steht für Lysosome-associated membrane glycoprotein 3 und kommt, wie der Name sagt, in der Membran von sauren Vesikeln und somit auch in MVBs und LBs vor [40]. Als Sekundärantikörper wurden Alexa555-anti-rabbit-IgG und Alexa555-

anti-mouse-IgG gewählt, da sie eine Emission im roten Wellenlängenbereich aufwiesen und somit einen guten Kontrast zu GFP/YFP bildeten. Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigten eine deutliche Ko-Lokalisation von Lamp3 mit dem C-terminalen Marker von WT ABCA3 (Abbildung 18 B, obere Reihe). Dies war gleichzusetzen mit der Lokalisierung von ABCA3 in MVBs und LBs, da es am C-Terminus im Laufe der Prozessierung nicht zu einer Abspaltung des Markers kommt. Hingegen gab es keinerlei Ko-Lokalisation von C-terminal markiertem ABCA3 mit Calnexin (Abbildung 18 B, untere Reihe). Auch das N-terminal markierte ABCA3 konnte nicht im ER lokalisiert werden (Abbildung 18 A, untere Reihe). Allerdings zeigte sich wie schon zuvor beim C-terminal markierten ABCA3 eine Kolokalisation von GFP mit Lamp3 (Abbildung 18 A, obere Reihe). Dies bedeutete, dass der N-terminus von ABCA3 und somit auch der Marker erst innerhalb der MVBs und LBs abgespalten worden sein konnte, was die bisherigen Ergebnisse untermauerte.

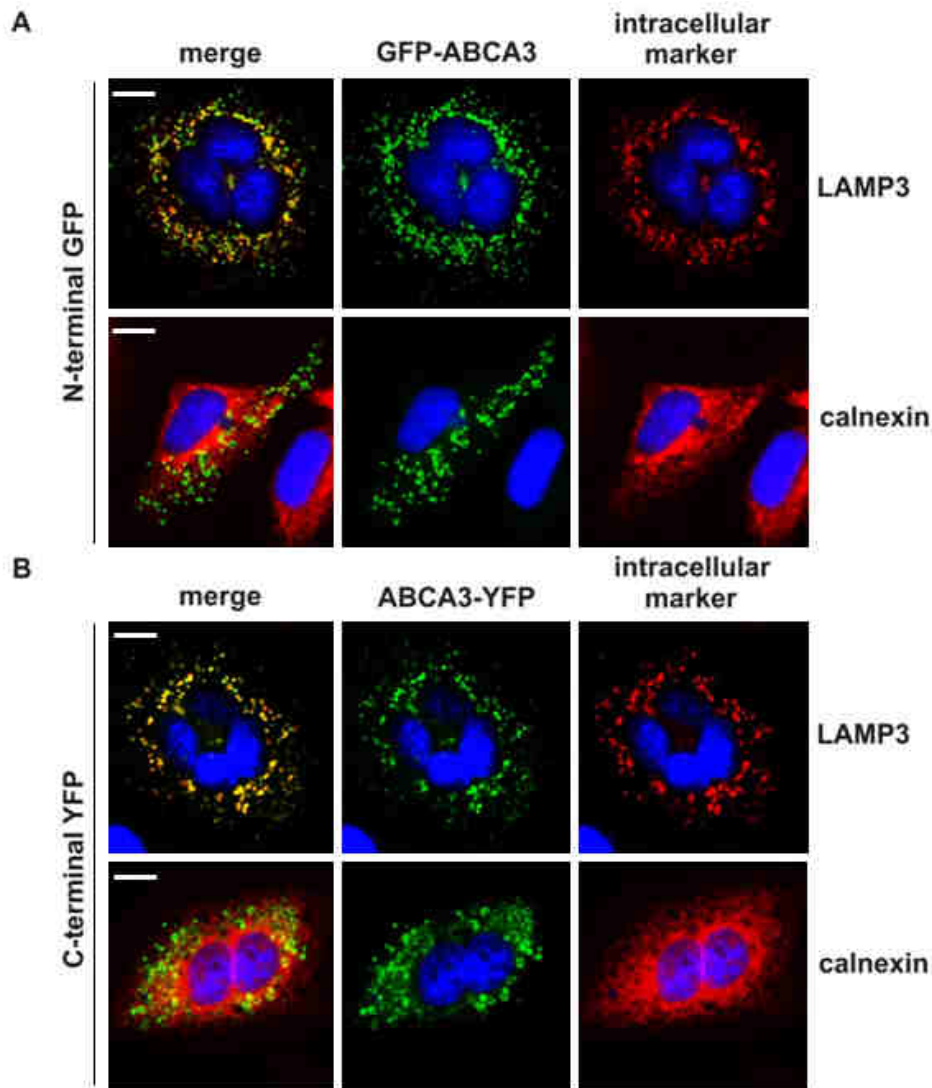


Abbildung 18: Nachweis des proteolytisch abgespaltenen N-Terminus von WT-ABCA3 in LBs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Sowohl im Fall von C-terminal (B), als auch im Fall von N-terminal markiertem WT-ABCA3(A) kann der Marker mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in MVBs/LBs nachgewiesen werden (jeweils obere Reihe). Somit muss die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 innerhalb dieser Strukturen erfolgen. Eine Ko-Lokalisation von WT-ABCA3 und dem ER zeigte sich in beiden Fällen nicht (A und B, jeweils untere Reihe).

4.1.7 Cysteinproteasen sind an der Prozessierung von ABCA3 beteiligt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ABCA3 in Lamp3 positiven Vesikeln (MVBs und LBs) am N-Terminus proteolytisch gespalten wird, stellte sich die Frage nach dem hierfür verantwortlichen Enzym. Von den Surfactantproteinen SP-B und SPC war bereits bekannt, dass Proteasen an ihrer Prozessierung beteiligt sind. Während SP-B sowohl von Cystein- als auch von Aspartat-Proteasen geschnitten wird [26-28], ist an der Prozessierung von SP-C

hauptsächlich die Cystein-Protease Cathepsin H beteiligt [30]. Da die Prozessierung von SP-B und SP-C in MVBs bzw. LBs stattfindet [26-30], bestand die Möglichkeit, dass dieselben Enzyme auch für die Spaltung der 190/220kDa großen Vorstufe von WT ABCA3 verantwortlich sind. Um diese Hypothese zu testen, kamen zwei unterschiedliche Proteaseinhibitoren zum Einsatz. Pepstatin A führte zu einer spezifischen Blockade von Aspartatproteasen, während die Cysteinproteasen mithilfe von E64 inhibiert wurden [26,27]. Da die zur effektiven Hemmung der Proteasen benötigte Konzentration zunächst nicht bekannt war, wurden stabil transfizierte A549-Zellen, welche WT ABCA3-HA^C exprimierten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eva Kaltenborn), über Nacht zunächst mit Konzentrationen zwischen 1 und 100µM behandelt. 100µM wurde als maximale Konzentration gewählt, da eine weitere Steigerung das Zellwachstum behindert hätte. Als Kontrolle blieb ein Teil der Zellen unbehandelt. Der durchgeführte Immunoblot zeigte bei den mit Pepstatin A behandelten Zellen keinerlei Unterschied zu den unbehandelten Zellen. Selbst bei der höchsten Konzentration (100µM) kam es zu keiner Verbreiterung der 190/220kDa Bande (Abbildung 19, links). Um einen eventuell nur schwach ausgebildeten Effekt nicht zu übersehen, wurden die Zellen in einem zweiten Ansatz noch einmal mit Pepstatin A behandelt. Diesmal erfolgte die Behandlung mit der maximalen Konzentration von 100µM über unterschiedlich lange Zeiten (1h, 5h, 18h, 24h) (Abbildung 19, rechts). Da selbst bei ansteigendem Behandlungszeitraum keine Akkumulation der ABCA3 Vorstufe auffiel, konnte davon ausgegangen werden, dass die Prozessierung ungehindert stattfinden konnte und Aspartatproteasen somit nicht an der N-terminalen Spaltung von WT ABCA3 beteiligt sind.

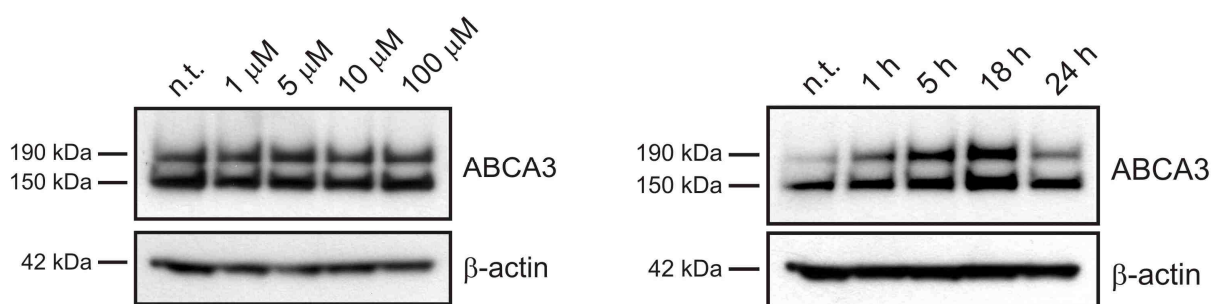


Abbildung 19: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Pepstatin-A-Behandlung erfolgte mittels Western Blot. Es zeigt sich weder bei der Anwendung einer ansteigenden Pepstatin A- Konzentration (links), noch bei der Behandlung der Zellen über eine zunehmende Dauer mit max. Konzentration (rechts) eine Akkumulation der 190kDa großen Form von WT-ABCA3. Somit sind Aspartatproteasen nicht an der proteolytischen Spaltung von WT-ABCA3 beteiligt.

Im Gegensatz hierzu kam es bei der Verwendung des Cysteinproteaseninhibitors E64 zu einer Akkumulation der 190/220 kDa großen Form von ABCA3 (Abbildung 20, links). Da dieser Effekt nur bei der höchsten Konzentration (100µM) zu erkennen war, wurde auch hier ein zweiter Versuch unternommen. Wie schon zuvor bei Pepstatin A wurden die stabilen Zellen diesmal alle mit der maximalen Konzentration (100µM) von E64 behandelt. Die Inkubation erfolgte über 1, 5, 18 und 24 Stunden (Abbildung 20, rechts). Das Ergebnis war eindeutig. Je länger die Zellen mit dem Cysteinproteaseinhibitor behandelt worden waren, desto stärker akkumulierte die ABCA3 Vorstufe. Zusätzlich war nach 24-stündiger Behandlung kaum noch reifes ABCA3 im Immunoblot nachweisbar. Die Prozessierung war also durch die Inhibition von Cysteinproteasen gestört worden. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dafür, dass Cysteinproteasen für die Abspaltung des N-Terminus von der 190/220kDa WT ABCA3 Vorstufe und somit für das Auftauchen der 150/180kDa Bande im Western Blot verantwortlich sind. Aspartatproteasen scheinen keine Bedeutung für die ABCA3-Prozessierung zu haben.

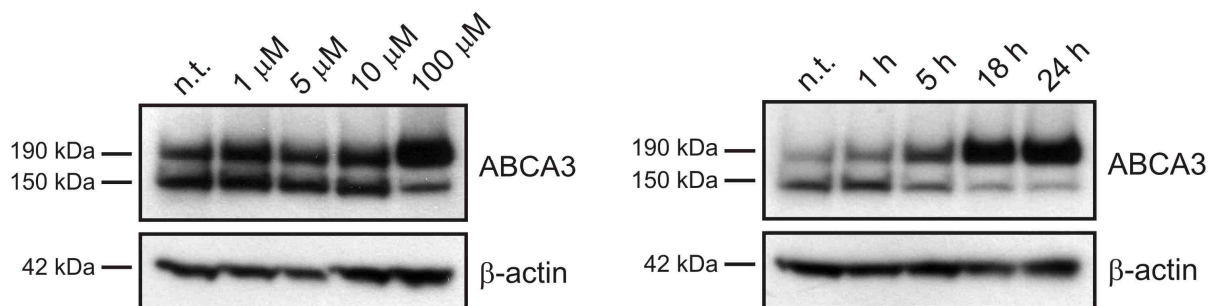


Abbildung 20: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit E64 (Cysteinproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der E64-Behandlung erfolgte mittels Western Blot. Bei Anwendung einer max. E64-Konzentration von 100µM (links) sowie bei der Behandlung der Zellen über eine zunehmende Dauer mit max. E64-Konzentration (rechts) zeigt sich eine Akkumulation der 190kDa großen Form von WT-ABCA3. Somit müssen Cysteinproteasen an der proteolytischen Spaltung von WT-ABCA3 beteiligt sein.

4.2 Prozessierung im Fall von ABCA3-Mutationen

4.2.1 E292V

4.2.1.1 E292V ist in LBs nachweisbar

Parallel zur Untersuchung der WT-Prozessierung erfolgte die Analyse der Prozessierung von zwei ABCA3-Mutationen, welche zur Entstehung des Atemnotsyndroms [77] bzw. einer Form der ILD führen können [11]. Zunächst wurde die ABCA3 Mutation E292V näher betrachtet. Bei dieser Mutation entsteht zwar ein korrekt gefaltetes Protein, jedoch ist die Funktion von ABCA3 aufgrund einer verminderten ATP-Hydrolyse-Kapazität gestört [13].

In einem ersten Schritt wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopie mit transient transfizierten HEK293-Zellen zur Lokalisationsbestimmung der mutierten ABCA3-Form durchgeführt. Für die Transfektion wurde der pub6-hABCA3-E292V-HA^C-Plasmid (zur Verfügung gestellt von Eva Kaltenborn) verwendet, welcher zur Expression eines C-terminal markierten Proteins führte. Die Zellen konnten nach Ablauf von 48h für die Immunfluoreszenz fixiert werden. Die Markierung von ABCA3 erfolgte mittels Rat-anti-HA-Antikörper von Roche als Primärantikörper, sowie Donkey-anti-rat Alexa 488 als Sekundärantikörper und führte somit zu einer Darstellung von ABCA3 im grünen Spektralbereich. Auch das ER, sowie die MVBs und LBs wurden mittels Antikörpern markiert. Hierbei wurde zur Darstellung des ERs erneut der Rabbit-anti-Calnexin-Antikörper, sowie zur Markierung von MVBs und LBs der Mouse-anti-Lamp3-Antikörper verwendet (s.o.). Als Sekundärantikörper dienten Alexa555-anti-rabbit-IgG und Alexa555-anti-mouse-IgG, welche beide eine Emission im roten Wellenlängenbereich aufwiesen.

Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigten, dass in Bezug auf E292V eine deutliche Ko-Lokalisation des mutierten Proteins mit Lamp3 (Abbildung 21, obere Reihe), jedoch keinerlei Ko-Lokalisation mit Calnexin bestand (Abbildung 21, untere Reihe). Dies bedeutete, dass E292V in MVBs und LBs nachweisbar war und somit nicht die Lokalisation des Transporters innerhalb der Zelle die Ursache für die Fehlfunktion darstellte und bestätigte frühere Ergebnisse von Matsumura et al. [13].

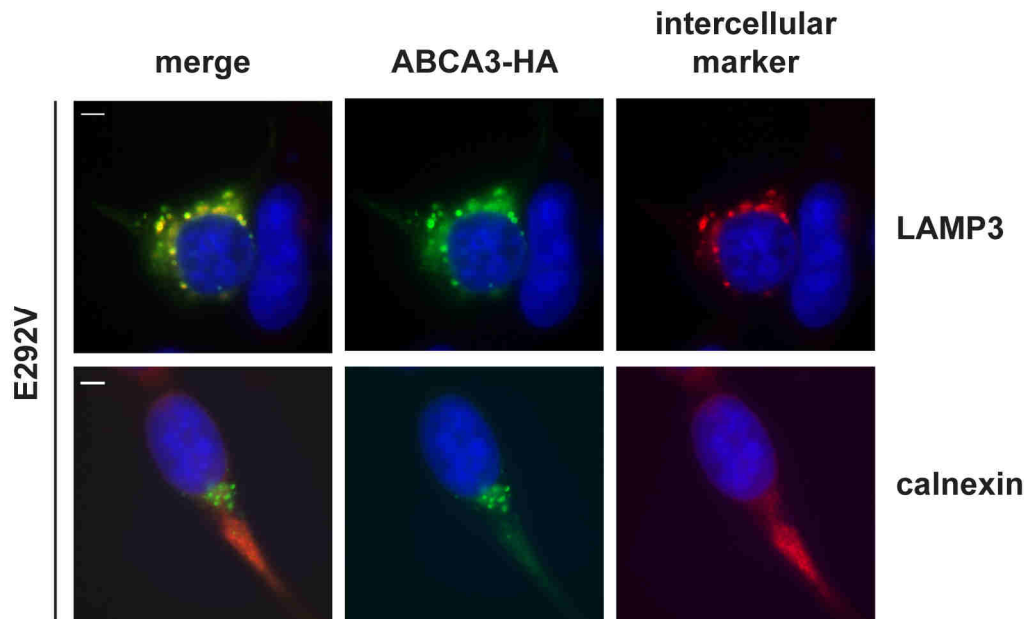


Abbildung 21: Immunfluoreszenzmikroskopie von mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Plasmid transfizierten HEK293 Zellen

Es zeigt sich eine Ko-Lokalisation der E292V-Mutante mit mit LAMP3 und somit MVBs/LBs (obere Reihe). Eine Ko-Lokalisation mit Calnexin und somit mit dem ER (untere Reihe) lässt sich nicht nachweisen.

4.2.1.2 E292V wird wie WT-ABCA3 N-terminal proteolytisch gespalten

Im Anschluss an die Immunfluoreszenz erfolgte erneut die transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit dem pub6-hABCA3-E292V-HA^C-Plasmid. Diesmal wurden die Zellen jedoch 48h nach der Transfektion zur Bildung von Zell-Lysaten und anschließenden Durchführung eines Immunoblots verwendet. Hierbei zeigten sich im Fall von E292V zwei Proteinbanden auf dem entwickelten Film. Die obere Bande wies eine Größe von 190kDa auf, während die Größe der unteren Bande 150kDa betrug. Somit entsprachen sie in ihrer Größe den Banden des WT-Proteins. (Abbildung 7: Seite 27), weshalb die Vermutung nahe lag, dass auch im Fall von E292V eine Abspaltung des N-Terminus im Lauf der Prozessierung erfolgte. Um dies zu bestätigen, erfolgte zunächst, wie im Fall des WTs, der Vergleich der Proteinexpression von transient und stabil transfizierten A549 Zellen im Western Blot. Wie schon beim WT, zeigte sich bei den stabil transfizierten Zellen eine deutlich stärker exprimierte 150kDa große untere Bande, während bei den transient transfizierten Zellen die unreife 190kDa große Form des Proteins überwog (Abbildung 22).

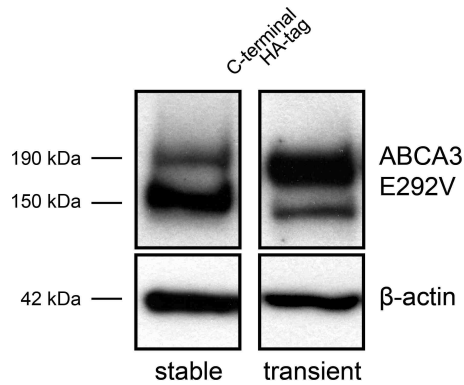


Abbildung 22: Vergleich zwischen transient und stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Plasmid transfizierten Zellen im Western Blot

Aus Zelllysaten wurde E292V-ABCA3 mittels HA-Taq im Western Blot sowohl in stabil als auch in transient transfizierten Zellen detektiert. Es zeigt sich eine deutlich stärkere Ausprägung der 150kDa großen Bande in den stabil transfizierten Zellen gegenüber den transient transfizierten Zellen. In Bezug auf Beta-Aktin ist kein Unterschied nachweisbar.

Dies spricht dafür, dass die Prozessierung von ABCA3 im Fall von E292V ungestört stattfinden und somit wie bei der WT-Prozessierung die reife 150kDa große Form aus der unreifen 190kDa großen Form durch proteolytische Spaltung hervorgehen kann.

Um auch für E292V den Ort der proteolytischen Spaltung identifizieren zu können, wurde erneut die Prozessierung von ABCA3 mithilfe dreier Antibiotika an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle unterbrochen. Hierzu wurden stabil mit pub6-hABCA3-E292V-HA^C-Plasmid transfizierte A549 Zellen mit Brefeldin A (BrefA), Monensin Sodium (Mon), oder Bafilomycin A1 (BafA) behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte in gleicher Konzentration, wie beim WT bereits beschrieben, über einen Zeitraum von 1h, 5h, 18h und 24h (nicht im Fall von Brefeldin A). Die Auswertung erfolgte auch hierbei durch Western Blot. In allen Fällen zeigte sich bei zunehmender Behandlungszeit eine Zunahme der 190kDa Bande und eine Abnahme der 150kDa Form von ABCA3. Somit führte sowohl die Behandlung mit Bref A (Abbildung 23), als auch die Inkubation mit Mon. (Abbildung 24) und BafA (Abbildung 25) zu einer Akkumulation der unreifen 190kDa großen Vorstufe von E292V. Dies zeigt, dass die proteolytische Spaltung von ABCA3 auch im Fall der Mutation erst am Zielort des Proteins, nämlich den MVBs und LBs stattfindet.

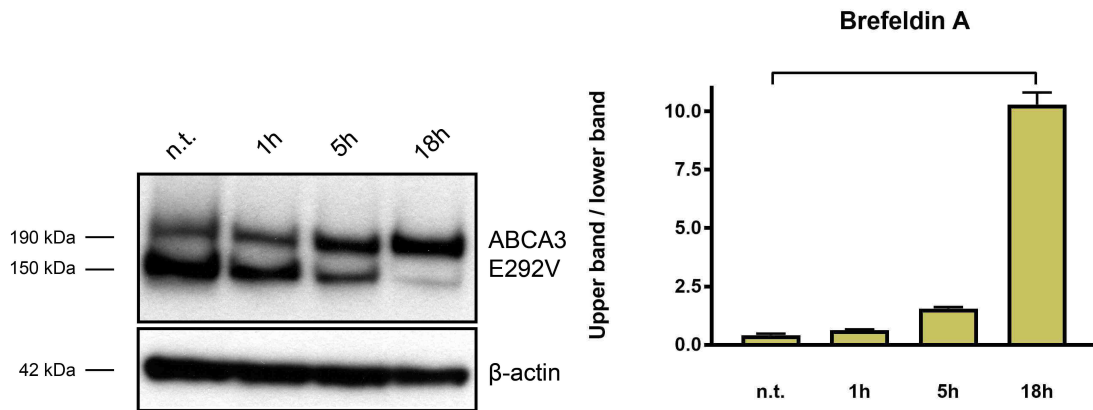


Abbildung 23: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Brefeldin A-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigte sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von E292V-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$).

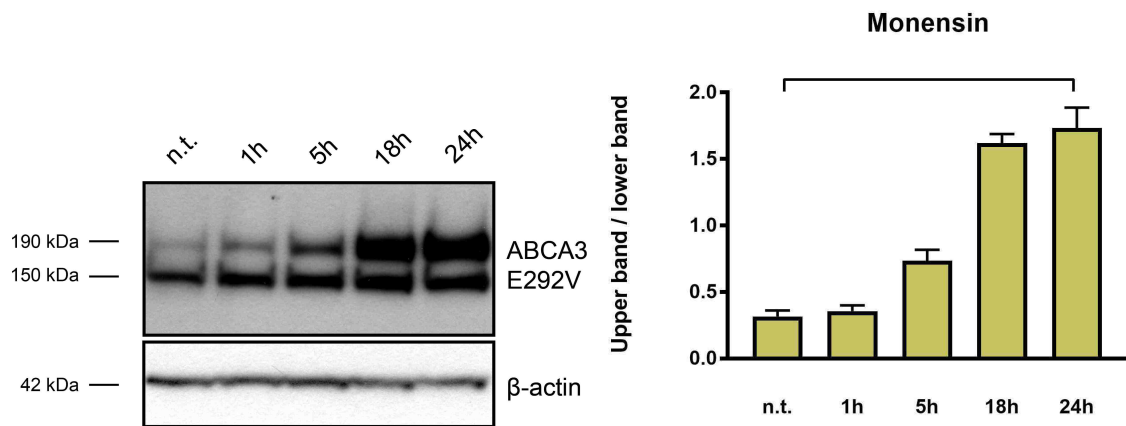


Abbildung 24: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3- E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Monensin und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Monensin-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigte sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von E292V-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$).

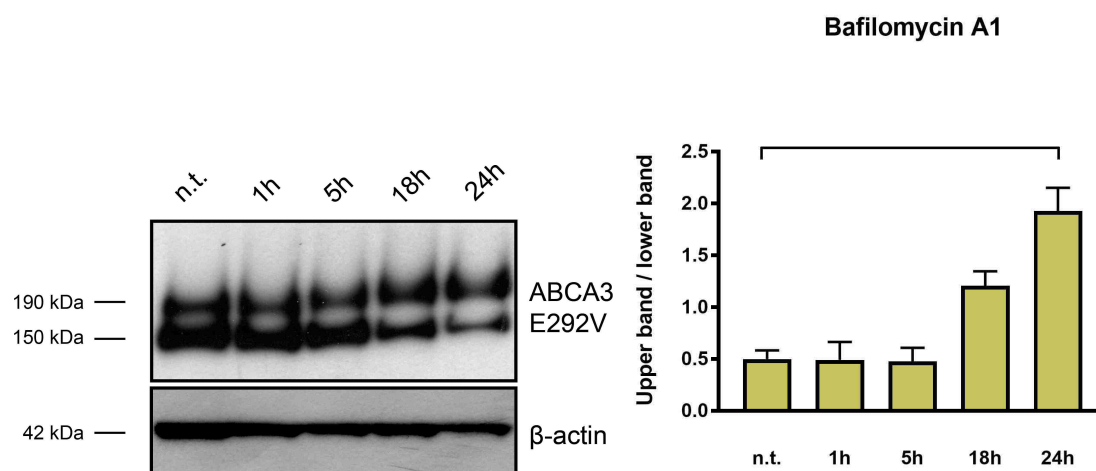


Abbildung 25: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Bafilomycin A1 und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Bafilomycin-A1-Behandlung erfolgte mittels Western Blot (links). Es zeigte sich eine ansteigende Akkumulation der 190kDa großen Form von E292V-ABCA3 mit Zunahme der Antibiotikainkubationszeit. Zum Zwecke der statistischen Auswertung (rechts) wurde die obere Bande jeweils mit der unteren Bande ins Verhältnis gesetzt (N=3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$).

4.2.1.3 Die N-terminale Spaltung von E292V erfolgt ebenfalls durch Cysteinproteasen

Mithilfe einer analog zum WT durchgeführte Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HA^C-Vektor transfizierten A549 Zellen mit den beiden Proteaseinhibitoren E64, bzw. Pepstatin A konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch im Fall von E292V Cysteinproteasen für die N-terminale Proteinspaltung verantwortlich sind. Dies zeigte sich wiederum im Western Blot durch eine zunehmende Akkumulation der 190kDa Form von E292V-ABCA3 bei ansteigender Dauer der E-64-Behandlungszeit (Abbildung 26) und ausbleibender Änderung im Fall von Pepstatin A (Abbildung 27).

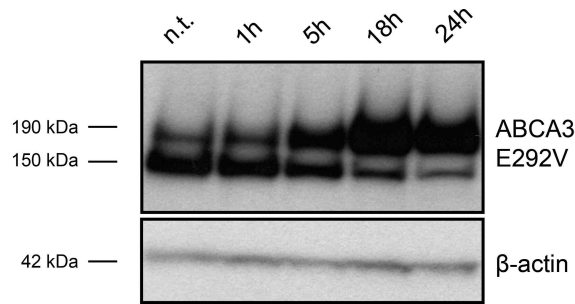


Abbildung 26: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit E64 (Cysteinproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der E64-Behandlung erfolgte mittels Western Blot. Bei Behandlung der Zellen über eine zunehmende Dauer mit einer E-64 Konzentration von 100 μ M zeigte sich eine Akkumulation der 190kDa großen Form von E292V-ABCA3. Somit müssen Cysteinproteasen an der proteolytischen Spaltung von E292V-ABCA3 beteiligt sein.

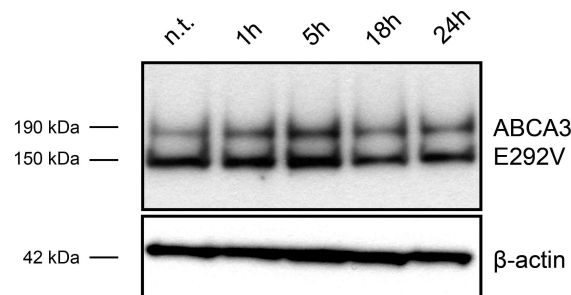


Abbildung 27: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Pepstatin-A-Behandlung erfolgte mittels Western Blot. Es zeigte sich keine Akkumulation der 190kDa großen Form von E292V-ABCA3 bei der Behandlung der Zellen mit Pepstatin A (100 μ M) über einen zunehmenden Zeitraum. Somit sind Aspartatproteasen nicht an der proteolytischen Spaltung von E292V-ABCA3 beteiligt.

4.2.2 Q215K

4.2.2.1 Q215K ist im ER nicht jedoch in LBs nachweisbar

Im Fall von Q215K handelt es sich um eine Proteinfehlfaltungsmutation Q215K [77]. Auch in ihrem Fall wurde zunächst eine Immunfluoreszenzmikroskopie analog zum Vorgehen bei der E292V Mutation durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Ko-Lokalisation von ABCA3 mit Calnexin, was einer Lokalisation dieses Proteins im ER entsprach (Abbildung 28, untere Reihe). Gleichzeitig waren kaum LBs nachweisbar, mit welchen zudem keine Ko-Lokalisation bestand (Abbildung 28, obere Reihe). Wie bereits Kaltenborn et al. [78]

beschrieben hatten, konnten wir hiermit zum einen zeigen, dass die Q215K Mutation im ER akkumuliert und zum anderen, dass ein funktionstüchtiges ABCA3-Protein eine wichtige Rolle in der LBs-Biogenese zu spielen scheint.

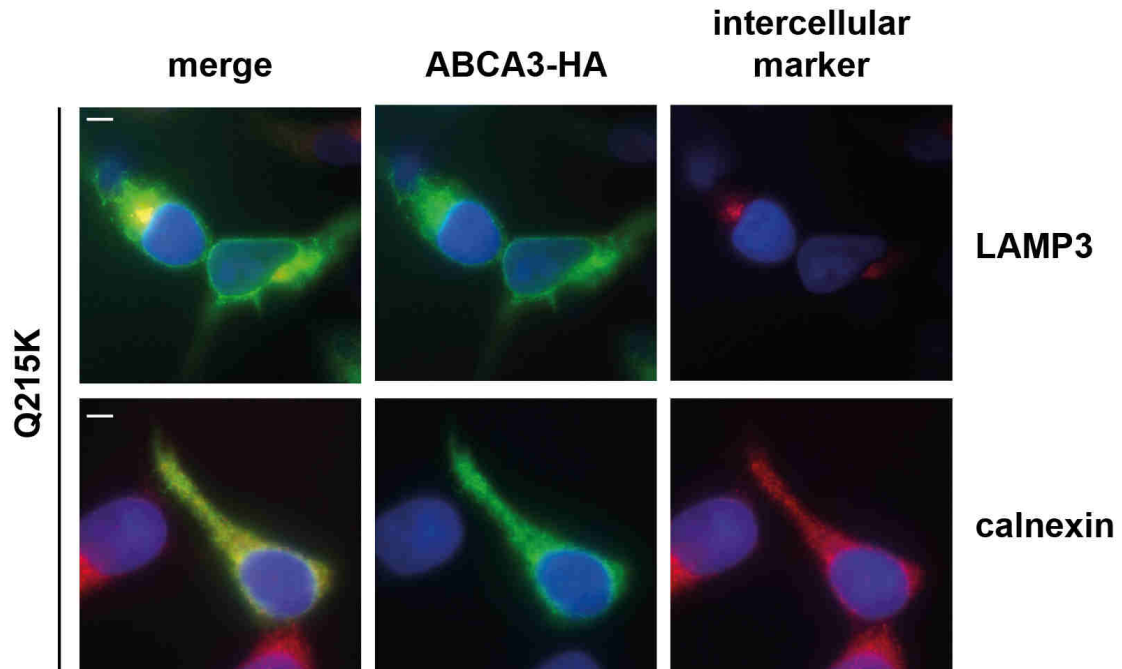


Abbildung 28: Immunfluoreszenzmikroskopie von mit dem pub6-hABCA3-Q215K-HAC-Plasmid transfizierten HEK293 Zellen

Es zeigt sich eine Ko-Lokalisation der Q215K Mutante mit Calnexin und somit mit dem ER (untere Reihe). Eine Ko-Lokalisation mit LAMP3 und somit MVBs/LBs lässt sich nicht nachweisen.

4.2.2.2 Bei Q215K unterbleibt die N-terminale proteolytische Spaltung

Auch im Western Blot kam Q215K, sowohl im Fall von stabil als auch im Fall von transient transfizierten Zellen, anders als der WT und E292V nur in Form einer Bande, nämlich der oberen 190kDa großen Form von ABCA3 zur Darstellung, während die untere 150kDa große Bande nicht nachweisbar war (Abbildung 6: Seite 26).

Es ist somit davon auszugehen, dass aufgrund der ER-Retention des fehlgefalteten Proteins die folgenden Schritte der Prozessierung von Q215K-ABCA3, und somit auch die proteolytische Spaltung innerhalb der LAMP3 positiven Organellen nicht stattfinden können. Dies führte dazu, dass auch die reife 150kDa Form nicht entstehen kann und erklärt zudem, warum es durch eine antibiotische Behandlung der stabil transfizierten Zellen mit BrefA, Mon und BafA zu keinerlei Änderung des Bandenmusters kam (Beispielhaft ist dies in Abbildung 29 anhand einer Behandlung mit Bref A zu sehen).

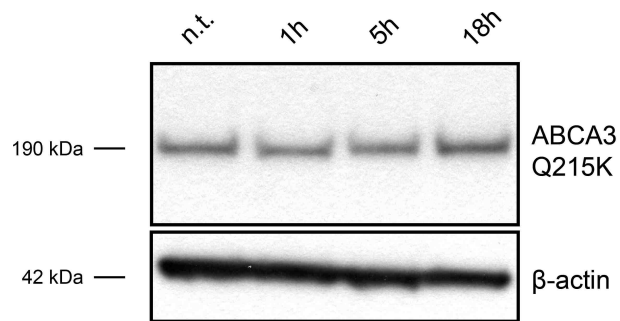


Abbildung 29: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-Q215K-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung

Die Auswertung der Brefeldin A-Behandlung erfolgte mittels Western Blot. Es zeigt sich unabhängig von der Dauer der Behandlung stets nur eine Bande mit einer Größe von 190kDa.

Die Prozessierung war bereits aufgrund des fehlgefalteten Proteins selbst unterbrochen worden. Folglich kann die Prozessierung und somit auch die proteolytische Spaltung von ABCA3 nicht nur durch Antibiotika, sondern auch durch Fehlfaltungsmutation wie Q215K verhindert werden.

5 Diskussion

5.1 Prozessierung von WT ABCA3

In dieser Arbeit wurde erstmals die Prozessierung des Surfactant-Phospholipid-Transporters ABCA3 genauer untersucht. Dieser spielt eine entscheidende Rolle in der Surfactant-Synthese sowie in der Biogenese der LBs [17-19]. Mutationen des betreffenden Gens können sowohl zur Ausbildung eines Atemnotsyndroms als auch zur Entstehung der Interstitiellen Lungenerkrankung führen, für welche bis zum heutigen Tag keine ausreichenden Therapieoptionen zur Verfügung stehen [6, 21]. Bei einigen dieser Mutationen kommt es aufgrund einer Proteinfehlfaltung zur ER-Retention von ABCA3. Dies führt zu einer Unterbrechung der weiteren Prozessierung und verhindert somit die Bildung eines funktionstüchtigen Surfactant-Lipid-Transporters [20]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen durch ein besseres Verständnis der WT-Prozessierung dazu beitragen, mögliche neue Therapieansatzpunkte zu identifizieren.

5.1.1 ABCA3 wird N-terminal proteolytisch gespalten

Nagata et al. haben bereits zu einem früheren Zeitpunkt über eine mögliche N-terminale Spaltung von ABCA3 spekuliert [22]. Bisher ist diese Hypothese aber nicht näher untersucht worden. Erste Hinweise auf eine proteolytische Prozessierung von ABCA3 am N-Terminus konnten aus dem Vergleich von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HA^C-Plasmid transfizierten A549-Zellen und transient transfizierten Zellen gewonnen werden [eigene Daten, 20]. In beiden Fällen kam es im Western Blot zur Ausbildung von je zwei Proteinbanden mit einer Größe von 190kDa und 150kDa, die sich jedoch in den jeweiligen Proteinmengen deutlich unterschieden (Abbildung 10: Seite 51). So wiesen die stabil transfizierten Zellen einen deutlich höheren Anteil der 40kDa kleineren Form von ABCA3 auf. Im Fall der transient transfizierten Zellen war hingegen die 190kDa große Form stärker ausgebildet. Hieraus lässt sich zum einen schließen, dass für die Entstehung des 150kDa großen ABCA3-Proteins ein längerer Zeitraum benötigt wird und zum anderen, dass die kleinere Form womöglich aus der 190kDa großen Vorstufe durch proteolytische Spaltung im Laufe der Prozessierung hervorgeht. Da beide Banden mit einem C-terminalen Marker detektiert werden konnten, muss sich eine mögliche Schnittstelle am N-Terminus befinden.

Die N-terminale proteolytische Spaltung von Transportern aus der ABCA-Familie konnte bereits für ABCA1 erfolgreich gezeigt werden. Bei ABCA1 handelt es sich wie bei ABCA3

um ein Glykoprotein, dessen Mutationen klinische Relevanz haben [23]. Aufgrund der Gemeinsamkeiten von ABCA3 und ABCA1 lag die Vermutung nahe, dass auch ABCA3 N-terminal proteolytisch prozessiert wird.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde zunächst ein Vektor kloniert, welcher in A549-Zellen eingebracht, zur Expression eines N-terminal markierten ABCA3-WT-Proteins führte. Bei diesem Vektor handelte es sich um den GFP^N-ABCA3-WT-Plasmid. Nachdem A549 Zellen zum einen Teil mit dem GFP^N-ABCA3-WT-Plasmid und zum anderen Teil mit einem GFP^C-ABCA3-WT-Vektor transient transfiziert worden waren, wurde erneut ein Western Blot durchgeführt. Das C-terminal markierte ABCA3-Protein kam erneut mit zwei Banden zur Darstellung, allerdings waren diese aufgrund der Verwendung von GFP als Markerprotein 30kDa größer, als bei der Verwendung des *HA-Taq* (Abbildung 12: Seite 54). Somit wiesen die beiden Banden eine Größe von 220 und 180kDa auf. Im Falle der mit dem GFP^N-ABCA3-WT-Plasmid transfizierten Zellen konnte im Gegensatz zum C-terminal markierten Protein nur eine Bande detektiert werden. Hierbei handelte es sich wie erwartet um die 220kDa große Form. Die 40 kDa kleinere Bande konnte für das N-terminal markierte ABCA3 nicht nachgewiesen werden, was die Vermutung bestätigte, dass der N-Terminus und somit der Marker im Laufe der Prozessierung abgespalten wird und es sich bei der kleineren Bande im Immunoblot um die reife Form von ABCA3 handelt.

Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass ABCA3 zwar ein Glykoprotein ist, es sich bei der kleineren 150/180kDa Form jedoch nicht lediglich um das deglykosylierte Protein handelt. Dies konnte von Matsumura et al. durch Deglykosylierung von ABCA3, welches in der glykosylierten Form sowohl komplexe als auch Mannose-haltige Zuckermoleküle enthält, gezeigt werden [20]. Während unter Verwendung des Enzyms Endo H lediglich Mannose-haltige Oligosaccharide von ABCA3 abgespalten werden können, führt PNGase F zu einer vollständigen Deglykosylierung von ABCA3, da es sowohl Mannose-haltige Oligosaccharide als auch komplexe Zuckermoleküle von ABCA3 entfernt. Die vollständige Deglykosylierung führte hierbei im Western Blot unter Verwendung des HA-Markers zu einer Verkleinerung des 190kDa Proteins um lediglich 10kDa. Dies bedeutet, dass sich die 190 und 150kDa große Form nicht allein in ihrem Oligosaccharidanteil unterscheiden, was wiederum für eine Abspaltung des N-Terminus im Rahmen der Prozessierung spricht. Die 150kDa große Form von ABCA3 zeigte keine Veränderung durch Deglykosylierung [20, 24, Abbildung 13: Seite 55]. Auch diese Tatsache ist durch eine N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 zu

erklären, da die Glykosylierung von ABCA3 am N-Terminus erfolgt und folglich mit der Abspaltung des N-Terminus auch die Zuckermoleküle von ABCA3 entfernt werden [22, 75]. Einen weiteren Hinweis darauf, dass ABCA3 N-terminal proteolytisch gespalten wird, liefert die Tatsache, dass zwei essentielle Surfactantbestandteile, nämlich Surfactant-Protein-B (SP-B) und Surfactant-Protein-C, ebenfalls in LBs proteolytisch prozessiert werden und somit die notwendigen Enzyme für eine proteolytische Prozessierung von ABCA3 in LBs vorhanden sind [25-30]. Bei SP-B und SP-C handelt es sich um hydrophobe Proteine, welche unter anderem eine entscheidende Rolle für die Ausbildung eines funktionsfähigen Surfactantfilms spielen, da sie zu einer weiteren Verringerung der Oberflächenspannung beitragen. Wie Mutationen von ABCA3, so können auch Mutationen von SP-B und SP-C zur Entstehung von Atemnotsyndrom und Interstitieller Lungenkrankheit führen [31-35].

Während an der Prozessierung von SP-B sowohl Aspartat- als auch Cystein-Proteasen beteiligt sind, wird SP-C hauptsächlich durch die Cysteinprotease Cathepsin H proteolytisch prozessiert. Allerdings konnten in beiden Fällen MVB bzw. LB als Ort der proteolytischen Spaltung identifiziert werden, was die Vermutung nahelegt, dass auch im Fall von ABCA3 die N-terminale Prozessierung in diesen LAMP3 positiven Vesikeln stattfindet [25-28, 30].

5.1.2 Identifizierung von LAMP3 positiven Vesikeln als Ort der proteolytischen Spaltung

Um dies zu bestätigen, wurde die Prozessierung von ABCA3 an unterschiedlichen Punkten innerhalb des Zellzyklus unterbrochen und die Ergebnisse hieraus mithilfe von Western Blot verglichen. Zur Anwendung kamen in diesem Fall stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HA^C-Vektor transfizierte A549-Zellen (zur Verfügung gestellt von Eva Kaltenborn), welche in unterschiedlichen Ansätzen mit den Antibiotika Brefeldin A (BrefA), Monensin Sodium (Mon) und Bafilomycin A1 (BafA) behandelt wurden. Diese Substanzen bewirken jeweils an spezifischen Stellen eine Unterbrechung der Proteinprozessierung und werden folglich häufiger zur genaueren Analyse von Prozessierungsabläufen verwendet [36-39]. So handelt es sich bei Brefeldin A um ein Lakton, welches zu einer Unterbrechung des Proteintransports zwischen ER und Golgi-Apparat führt [36]. Im Gegensatz hierzu unterbricht das Antibiotikum Monensin die Proteinprozessierung erst im späteren Verlauf. Es führt innerhalb des Trans-Golgi-Netzwerks zu einem Zusammenbruch von Na⁺- und H⁺-Konzentrationsgradienten und bewirkt somit an dieser Stelle eine Unterbrechung des weiteren

Proteintransports [36-37]. Bafilomycin A1 greift zu einem noch späteren Zeitpunkt in die Prozessierung ein. Es handelt sich bei dieser Substanz um einen spezifischen Blocker einer bestimmten Untergruppe von H⁺-ATPasen. Diese ATPasen spielen unter anderem eine wichtige Rolle im Aufbau eines sauren pH-Wertes innerhalb von LBs. Der saure pH-Wert ist wiederum Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit einer Reihe von Proteasen, zu welchen u.a. auch die Proteasen zählen, die an der Prozessierung von SP-B und SP-C beteiligt sind. Der Einsatz von Bafilomycin A führt folglich erst auf der Stufe der LBs zu einer Unterbrechung der Proteinprozessierung von ABCA3. Sämtliche früheren Schritte können somit ungestört ablaufen [38-39].

Durch die Auswertung der schrittweisen Unterbrechung der Prozessierung von ABCA3 unter Verwendung von Immunoblots konnte gezeigt werden, dass die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3, genau wie die Prozessierung von SP-B und SP-C innerhalb von MVB/LB stattfindet [25-30].

Je länger die stabil transfizierten A549-Zellen mit dem jeweiligen Antibiotikum behandelt worden waren, desto weniger ausgeprägt war im Anschluss daran die 150kDa kleine Bande im Western Blot. Die 190kDa große Form von ABCA3 akkumulierte hingegen mit zunehmender Dauer der Antibiotikatherapie (Abbildungen Nummer 15-17). Dieses Bild zeigte sich sowohl beim Einsatz von Brefeldin A, als auch bei der Anwendung von Monensin und Bafilomycin. Im Fall von Brefeldin A bedeutete dies, dass die N-terminale proteolytische Prozessierung von ABCA3 nach dem ER erfolgen musste, da Brefeldin A zwar den Transport von Proteinen zwischen dem ER und Golgi-Apparat unterbricht, die vorherigen Schritte der Proteinprozessierung jedoch unbeeinflusst lässt. Würde die Abspaltung des N-Terminus innerhalb des ERs erfolgen, so hätten sich im Western Blot die Proteinmengen der 150 und 190kDa großen Banden der behandelten Zellen nicht von denen der unbehandelten stabil transfizierten A549-Zellen unterschieden. Die kleinere 150kDa Form hätte ungehindert aus der größeren 190kDa Vorstufe entstehen können und diese wäre wiederum nicht akkumuliert. Durch den Einsatz von Monensin und Bafilomycin A konnte der Ort der N-terminalen Prozessierung von ABCA3 noch weiter eingegrenzt werden. Im Western Blot zeigte sich im Anschluss an die Antibiotikatherapie dasselbe Bild wie zuvor schon bei Brefeldin A. Es kam in beiden Fällen erneut zur Proteinakkumulation der 190kDa Vorstufe und zur Abnahme der Proteinmenge der 150kDa prozessierten Form von ABCA3, je länger die Zellen zuvor den Substanzen ausgesetzt worden waren. Mithilfe von Monensin konnte somit der Golgi-Apparat als Ort der proteolytischen Spaltung ausgeschlossen werden, da Monensin, wie oben bereits

erwähnt, zum Abbruch der Proteinprozessierung im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerks führt. Um endgültig sicher zu gehen, dass der N-Terminus von ABCA3 innerhalb der LAMP3 positiven, sauren MVBs bzw. LBs erfolgt, wurde Bafilomycin eingesetzt, da es die Prozessierung spezifisch innerhalb dieser Strukturen hemmt. Die Abnahme der 150kDa prozessierten Form von ABCA3 unter zunehmender Dauer der Bafilomycinbehandlung bestätigte somit die Hypothese, dass die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 erst innerhalb von MVB/LBs stattfindet.

Dies bedeutete, dass es möglich sein musste, N-terminal markiertes ABCA3, bzw. den abgespaltenen N-Terminus innerhalb von MVBs/LBs nachzuweisen. Hierfür kam die Immunfluoreszenz zum Einsatz. Nachdem A549-Zellen zum einen Teil mit dem GFP^N-ABCA3-WT-Vektor und zum anderen Teil mit dem YFP^C-ABCA3-WT-Vektor transient transfiziert worden waren, war es nötig, die MVBs/LBs innerhalb dieser Zellen zu markieren, um eine Lokalisation von ABCA3 innerhalb dieser Strukturen darstellen zu können.

Wie oben bereits erwähnt, gehören LBs zur Familie der Lysosomen. So ist es nur verständlich, dass einige Proteine, die in Lysosomen vorkommen, auch in LBs detektiert werden können. Eines dieser Proteine ist das "lysosome-associated membrane glycoprotein 3" (LAMP3), welches somit zur Markierung von MVBs/LBs in der Immunfluoreszenz eingesetzt werden konnte [40]. Um gegebenenfalls eine reine ER-Lokalisation des N-terminal markierten ABCA3 nachweisen zu können, fand als weiterer Marker Calnexin Verwendung. Hierbei handelt es sich um ein Integralprotein des ER, welches als Chaperon fungiert und für das ER spezifisch ist.

Die Immunfluoreszenz wurde zunächst mit dem C-terminal markierten ABCA3 durchgeführt (Abbildung 18 B: Seite 61). Hierbei zeigte sich die bereits bekannte Ko-Lokalisation von WT ABCA3 mit den LAMP3-positiven Vesikeln MVBs/LBs. Eine Ko-Lokalisation mit Calnexin, und somit mit dem ER, konnte nicht nachgewiesen werden. Im Anschluss hieran erfolgte die erneute Durchführung einer Immunfluoreszenz-Mikroskopie, diesmal mit den A549-Zellen, welche N-terminal markiertes ABCA3 exprimierten. Hierbei zeigte sich dasselbe Bild wie zuvor schon für das C-terminal markierte Protein. ABCA3 und somit der N-Terminus, der den Marker beinhaltete, kolokalisierte nicht mit Calnexin, sondern mit LAMP3 (Abbildung 18 A: Seite 61). Dies war der endgültige Beweis dafür, dass der N-Terminus erst innerhalb von MVBs/LBs abgespalten werden konnte. Denn eine proteolytische Spaltung zu einem früheren Zeitpunkt hätte die Abspaltung des N-terminalen Markers und somit eine ausbleibende Fluoreszenz von ABCA3 innerhalb dieser Strukturen zur Folge gehabt.

5.1.3 Cysteinproteasen als verantwortliche Enzyme der proteolytischen Spaltung

Nachdem die bisherigen Ergebnisse zeigen konnten, dass ABCA3 innerhalb von LBs N-terminal proteolytisch gespalten wird, war es im nächsten Schritt wichtig, das für diesen Prozess verantwortliche Enzym zu identifizieren. Hierbei war die Tatsache von Bedeutung, dass sowohl ABCA3 als SP-B und SP-C innerhalb von LBs proteolytisch prozessiert werden [25-30]. Dies legte die Vermutung nahe, dass an der Abspaltung des N-Terminus von ABCA3 ähnliche, wenn nicht gar dieselben Enzyme beteiligt sind wie an der Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine.

Im Fall von SP-B konnten mehrere Enzyme identifiziert werden, die für die proteolytische Spaltung der Proteinvorstufe entscheidend sind. Es handelt sich hierbei zum einen um die Aspartatproteasen Napsin A und Pepsinogen C und zum anderen um die Cysteinprotease Cathepsin H, welche sämtlich in LBs nachweisbar sind [26-28].

Auch an der proteolytischen Prozessierung von SP-C ist die Cysteinprotease Cathepsin H beteiligt. Jedoch scheinen Aspartatproteasen hierbei keine Rolle zu spielen [30].

Somit standen zwei Enzymklassen, nämlich Aspartat- und Cysteinproteasen als mögliche Verantwortliche für die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 fest. Um herauszufinden, ob und wenn ja, welche dieser Enzyme tatsächlich an der Prozessierung von ABCA3 beteiligt sind, kamen die Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64 zum Einsatz.

Bei Pepstatin A handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor von Aspartatproteasen, der bereits erfolgreich in der Analyse der einzelnen Prozessierungsschritte von SP-B eingesetzt worden war [26]. Auch der Proteaseinhibitor E64 ist dafür bekannt, dass er die Prozessierung von SP-B unterbrechen kann, jedoch wirkt dieser nicht durch eine Blockierung von Aspartatproteasen, sondern durch die Inhibition von Cysteinproteasen [27].

Um einen möglichen Einfluss der Proteaseinhibitoren auf die Prozessierung von ABCA3 erkennen zu können, wurden stabil transfizierte A549 Zellen zunächst in aufsteigender Konzentration und im Anschluss daran über eine zunehmende Dauer entweder mit Pepstatin A oder E64 behandelt. Die Ergebnisauswertung erfolgte erneut mithilfe von Western Blot (Abbildungen 19 und 20). Hierbei konnte im Fall des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A keinerlei Effekt auf die Prozessierung von ABCA3 nachgewiesen werden. Die N-terminale proteolytische Spaltung fand ungehindert von der Dauer der Behandlung und Höhe der Konzentration statt. Somit kam es weder zu einer Abnahme der Proteinmenge der 150kDa kleineren Form von ABCA3, noch zu einer Akkumulation der 190kDa großen Vorstufe.

Aspartatproteasen konnten somit als verantwortliche Enzyme für die proteolytische Prozessierung von ABCA3 ausgeschlossen werden.

Anders sahen die Ergebnisse im Bezug auf E64 aus. Hierbei zeigte sich im Western Blot abhängig von Konzentration und Dauer der Behandlung der stabil transfizierten A549-Zellen eine deutliche Verbreiterung der oberen 190kDa großen Bande, während die untere Bande an Breite abnahm. Dies bedeutet, dass der Cysteinproteaseinhibitor E64, wie schon zuvor Brefeldin A, Monensin und Bafilomycin A in der Lage ist, die Prozessierung von ABCA3 zu unterbrechen und zu einer Akkumulation der 190kDa Vorstufe von ABCA3 führt.

Zusammenfassend beweisen diese Ergebnisse, dass ABCA3 in LBs von Cysteinproteasen N-terminal proteolytisch gespalten wird.

5.2 N-Terminus als mögliches Signalpeptid

Auch wenn die bisherigen Ergebnisse die proteolytische Abspaltung des N-Terminus durch Cysteinproteasen am Ende der Prozessierung von ABCA3 belegen konnten, so blieb die Funktion des N-Terminus zunächst weiter unklar. Im Falle von ABCA1, einem anderen Mitglied aus der Gruppe der *ATP-binding cassette transporter*, konnte, wie oben bereits erwähnt, von Tanaka et al. gezeigt werden, dass auch dieses Protein N-terminal proteolytisch gespalten wird. Fitzgerald et al. sind in diesem Punkt zwar einer anderen Meinung, jedoch stimmen beide Quellen darin überein, dass der N-Terminus als Signalpeptid dient, welches für die korrekte Lokalisation des Transporters innerhalb der Zelle und dessen Einbau in Membranen verantwortlich ist [23, 41]. Zudem fanden Fitzgerald et al. heraus, dass ohne den N-Terminus eine stabile Expression von ABCA1 behindert wird. Es ist folglich wahrscheinlich, dass auch der N-Terminus von ABCA3 als Signalpeptid dient und letztendlich für die Lokalisation von ABCA3 in der äußeren Membran von LBs verantwortlich ist. Dies würde auch erklären, wieso der N-Terminus erst innerhalb dieser LAMP3 positiven Vesikel abgespalten wird und nicht bereits zu einem früheren Zeitpunkt.

Mittlerweile konnten Beers et al. einen bisher unbekannten Zielmarker im N-Terminus von ABCA-Transportern im Allgemeinen und ABCA3 im Speziellen identifizieren und zeigen, dass dieser für den Transport von ABCA3 in den Post-Golgi-Apparat benötigt wird [76]. Ob dieser Marker auch für den Weitertransport von ABCA3 in die LBs verantwortlich ist, muss noch gezeigt werden. Sicher ist mittlerweile jedoch, dass es ohne eine N-terminale Glykosylierung zu einem Abbau von ABCA3 in Proteasomen kommt und die N-terminale Glykosylierung somit für die Stabilität des Proteins erforderlich ist [75].

Um mögliche Schnittstellen innerhalb des N-Terminus von ABCA3 zu identifizieren, wurden die Programme SignalP 3.0 und Signal-3L verwendet. Diese sind speziell für die Identifikation von Signalpeptiden und möglichen Schnittstellen entwickelt worden [42, 43]. Es zeigte sich, dass der N-Terminus ein mögliches Signalpeptid enthält und sich eine mögliche Schnittstelle zwischen dem 36. und 48. Residue zu Beginn der ersten extrazytoplasmatischen Schleife befindet. Die exakte Lokalisation der Schnittstelle muss zwar noch durch weitere Experimente endgültig identifiziert werden, es ist jedoch wichtig zu wissen, dass die erste extrazytoplasmatische Schleife von ABCA3 zur Innenseite von LBs hin ausgerichtet ist. Somit ist die potentielle Schnittstelle dem sauren Milieu ausgesetzt, welches die Cysteinproteasen für ihre Funktionsfähigkeit benötigen. Einer N-terminalen proteolytischen Spaltung von ABCA3 durch Cysteinproteasen innerhalb von LBs wäre somit nichts entgegengesetzt.

5.3 Funktion der 180/150kDa großen Form von ABCA3

Wie bereits mehrfach erwähnt, kommt der WT von ABCA3 im Western Blot durch zwei Banden zur Darstellung (Bandengröße abhängig vom verwendeten Marker). Bisher konnte gezeigt werden, dass die mit 180/150kDa kleinere Form aus der 220/190kDa Vorstufe durch proteolytische Abspaltung des N-Terminus hervorgeht und dieser als Signalpeptid dient. Auch LBs, als Ort dieses Prozesses, und Cysteinproteasen als verantwortliche Enzyme konnten identifiziert werden. Im Folgenden ist es nun wichtig, die Bedeutung der 150kDa großen Form für die Funktionsfähigkeit von ABCA3 zu erläutern. Da die prozessierte Form in stabil transfizierten Zellen stärker ausgebildet ist als in transient transfizierten Zellen und diese zudem in LBs nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der 180/150kDa Form von ABCA3 um das reife, funktionstüchtige Protein handelt und die 220/190kDa-Form lediglich eine funktionsuntüchtige Vorstufe darstellt. Auch die Tatsache, dass im humanen Lungengewebe die 180/150kDa-Form vorherrschend ist [13, 69] und Matsumura et al zudem zeigen konnten, dass die 180/150kDa-Form eine höhere ATP-Hydrolyse-Aktivität aufweist als die 220/190kDa Form, spricht für diese Vermutung [20].

Um diese These weiter zu untermauern, ist es hilfreich, zwei bekannte Mutationen von ABCA3, nämlich Q215K und E292V, näher zu betrachten.

Diese Mutationen führen über zwei unterschiedliche Mechanismen zu einem funktionsunfähigen bzw. funktionsgemindertem ABCA3. Während im Fall von E292V lediglich die ATP-Hydrolase-Kapazität verringert ist [13], so kommt es bei der Mutation

Q215K zu einer kompletten Fehlfaltung des Proteins und als Folge zu einer Akkumulation von ABCA3 im ER [77]. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass Kinder, die homolog für die Mutationen E292V sind, an einer relativ milden Form der ILD erkranken, während die Mutation Q215K häufig bereits kurz nach der Geburt zum Tod durch Entstehung eines akuten Atemnotsyndroms führt [11, 13, 20, 77].

Zunächst sollen die Merkmale der Mutation E292V näher erläutert werden. Bei dieser Mutation entsteht, wie bereits erwähnt, ein korrekt gefaltetes Protein mit eingeschränkter ATP-Hydrolase-Aktivität, welche einen Funktionsverlust zur Folge hat [13]. Dieser Funktionsverlust scheint jedoch nicht vollständig zu sein, da zum einen weiterhin LBs nachweisbar sind und die Mutationen zum anderen, wie oben bereits erwähnt, zur Entstehung einer relativ milden Form der ILD führen [11, 13]. Außerdem kann ABCA3 im Fall der Mutation E292V im Gegensatz zu Proteinfehlfaltungsmutationen, in LBs nachgewiesen werden. Eine Proteinakkumulation bleibt aus. Dies wird besonders in der Immunfluoreszenz deutlich. Hierbei zeigt sich eine eindeutige Kolo-kalisation des mutierten ABCA3 mit LBs, wie dies auch beim WT der Fall ist (Abbildung 21: Seite 65). Aufgrund der korrekten Lokalisation in LBs ist davon auszugehen, dass auch die N-terminale proteolytische Spaltung durch Cysteinproteasen wie beim WT ungehindert stattfindet. Dieser Verdacht wird dadurch erhärtet, dass WT und die E292V-Mutante im Western Blot ein identisches Muster zeigen. So kommen bei Verwendung des HA-Antikörpers in beiden Fällen zwei Banden mit der Größe von je 190 und 150kDa zur Darstellung (Abbildung 7: Seite 27). Dies beweist, dass die Prozessierung und somit die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 auch im Fall von E292V ungestört ablaufen kann, denn sonst wäre im Western Blot nur die obere Bande nachweisbar. Wie zuvor schon beim WT, so konnte auch bei E292V die Prozessierung mithilfe der Antibiotika Brefeldin A, Monensin und Bafilomycin A unterbrochen werden. Hierbei zeigte sich die bekannte Verbreiterung der oberen Bande, während sich die Proteinmenge der 150kDa Form verringerte (Abbildungen 23-25: Seiten 67-68).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der Funktionsverlust der Mutation E292V nicht auf einer gestörten Proteinprozessierung, sondern lediglich auf einer verminderten ATP-Hydrolyse-Kapazität beruht. Diese Ergebnisse erlauben somit keinen Rückschluss auf eine mögliche Bedeutung der 180/150kDa prozessierten Form für die Funktionsfähigkeit von ABCA3.

Anders sieht es aus, wenn man die Mutation Q215K näher betrachtet. Bei Q215K handelt es sich im Gegensatz zu E292V um eine Fehlfaltungsmutation [20, 77]. Dies bedeutet, dass eine

Störung in der Faltung von ABCA3 zum Funktionsverlust des Proteins führt. Die Folge ist eine gestörte Surfactant-Homöostase, die bei Kindern, die homolog für diese Mutation sind, zur Ausbildung eines schweren Atemnotsyndroms führt, welches wie oben bereits erwähnt häufig kurz nach der Geburt zum Tod führt [20, 77]. Die Auswirkungen der Mutation Q215K sind also deutlich gravierender als im Fall von E292V. Der Grund hierfür besteht unter anderem darin, dass das mutierte ABCA3-Protein aufgrund der Fehlfaltung seinen Wirkort, die LBs nicht erreicht. Dies lässt sich zum einen dadurch beweisen, dass sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Kolokalisation von Q215K mit dem ER-Marker Calnexin zeigt, während eine Kolokalisation mit LAMP3 ausbleibt (Abbildung 28: Seite 70). Und zum anderen erfolgt im Fall von Fehlfaltungsmutationen wie Q215K keine Glykosylierung von ABCA3 [20]. Auch die Anzahl der LBs ist im Vergleich zum WT deutlich verringert [21, 24, 77]. Dies unterstreicht die Bedeutung von ABCA3 für die LB-Biosynthese und zeigt in Zusammenschau mit den klinischen Auswirkungen der Mutation, dass ein im ER retiniertes ABCA3 funktionsuntüchtig ist [20, 77].

Betrachtet man nun das Bandenmuster von Q215K im Vergleich mit dem WT im Western Blot, so fällt auf, dass im Fall der Mutation nur die obere 220/190kDa Bande zur Darstellung kommt (Abbildung 6: Seite 26). Dies ist nur logisch, wenn man bedenkt, dass das mutierte Protein im ER akkumuliert und somit die LBs nicht erreicht. Diese stellen jedoch, wie gezeigt werden konnte, den Ort der N-terminalen proteolytischen Spaltung von ABCA3 dar. Das im ER akkumulierte ABCA3 kann folglich nicht durch Cysteinproteasen gespalten werden. Die prozessierte 40kDa kleinere Form entsteht im Fall von Q215K nicht und ist somit im Western Blot auch nicht zu detektieren.

Die Prozessierung von ABCA3 kann also nicht nur durch Antibiotika wie Brefeldin A, Monensin und Bafilomycin unterbrochen werden, sondern auch durch bestimmte Mutationen, wie Q215K. Das Ausbleiben der N-terminalen proteolytischen Spaltung führt hierbei zu einer Akkumulation der 190kDa Form von ABCA3. Im Fall von Q215K kann überhaupt keine 180/150kDa große Form von ABCA3 entstehen. Da Kinder mit dieser Mutation an einer schweren Form des Atemnotsyndroms erkranken, ist davon auszugehen, dass die 220/190kDa Form nicht funktionstüchtig ist.

Zusammenfassend lässt sich folglich schließen, dass es sich bei der 180/150kDa Form von ABCA3 um den eigentlichen Phospholipidtransporter handelt und die Ausbildung eines funktionstüchtigen Surfactantfilms die ungestörte Prozessierung von ABCA3 voraussetzt.

5.4 Chaperone als mögliche Therapieoption

Die Ergebnisse aus der Analyse der Prozessierung von ABCA3 sowie die Identifikation der 180/150kDa Form von ABCA3 als funktionsfähiger Phospholipidtransporter können eventuell zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in der Therapie der familiären ILD und des Atemnotsyndroms beitragen. Dies gilt besonders in Bezug auf Fehlfaltungsmutationen von ABCA3 wie Q215K.

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten die homolog für die Mutation Q215K sind, aufgrund von Faltungsfehlern lediglich die 220/190kDa Form von ABCA3 exprimieren, welche die LBs nicht erreicht und funktionsunfähig ist. Wenn es in diesen Fällen gelingen würde, die Fehlfaltung von ABCA3 zu korrigieren, und somit die Prozessierung von ABCA3 incl. der N-terminalen proteolytischen Spaltung ungestört ablaufen könnte, so wäre es wahrscheinlich, dass auch diese Patienten einen funktionstüchtigen Phospholipidtransporter bilden könnten. Dies würde zu einer Verbesserung der Surfactant-Homöostase und Linderung der Symptomatik der betroffenen Patienten führen.

Ein möglicher Ansatz dieses Ziel zu erreichen, könnte im Einsatz von Chaperonen liegen [24]. Bei Chaperonen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, welche wiederum andere Proteine bei der korrekten Faltung unterstützen [44]. Sie kommen ubiquitär in Prokaryonten und Eukaryonten vor. Durch ihre Bindung an ungefaltete Proteine stabilisieren sie diese und verhindern somit deren Akkumulation [45]. Zu den bekanntesten, natürlich vorkommenden Chaperonen zählt die Gruppe der *heat-shock proteins* (HSP), welche bei der Einwirkung von Stressfaktoren wie Hitze vermehrt von der Zelle gebildet werden, um zu verhindern, dass unter diesen Bedingungen fehlgefaltete Proteine entstehen [46].

Neben diesen natürlich vorkommenden Faltungshelfern finden mittlerweile auch immer mehr chemische und pharmakologische Chaperone Verwendung in Forschung und Klinik. Beispiele für chemische Chaperone sind Glycerol und Myoinositol, welche beide bereits in der Cystischen Fibrose-Forschung Verwendung fanden [47].

Cystische Fibrose ist eine Stoffwechselerkrankung, der ein defekter Chloridtransporter, der sogenannte *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), zugrunde liegt. Bei diesem Chloridtransporter handelt es sich, wie bei ABCA3, um einen Transporter aus der *ATP binding cassette* (ABC) Familie. Der Defekt des Transporters an der apikalen Membran von Drüsenzellen bewirkt die Bildung besonders visköser Schleime. Diese führen wiederum zu einer Verstopfung der Drüsenausführungsgänge. Im Vordergrund steht hierbei die chronische Lungenerkrankung, jedoch sind neben der Lunge auch zahlreiche andere Organe betroffen

[50]. Die häufigste Mutation im CFTR-Gen ist die Mutation deltaF508. Hierbei handelt es sich um eine Fehlfaltungsmutation, welche bereits sehr früh zu einem Abbruch der Proteinprozessierung und einer ER-Akkumulation des Chloridtransporters führt, der folglich nicht die apikale Membran der Drüsenzellen erreichen kann [51].

Sowohl für Glycerol [48], als auch für Myoinositol [49] konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, die Prozessierung der bekanntesten CF-Mutation F508del-CFTR zu verbessern, indem sie das neu synthetisierte Protein stabilisieren und somit einer Akkumulation im ER entgegenwirken. Dies führt dazu, dass der Chloridtransporter zur apikalen Zellmembran transportiert werden kann, um dort seine Funktion aufzunehmen [48, 49].

Im Gegensatz zu diesen lediglich experimentell eingesetzten chemischen Chaperonen, handelt es sich bei pharmakologischen Chaperonen um deutlich spezifischere Substanzen [47], die eventuell in der Klinik Einsatz finden könnten. Die Bedeutung pharmakologischer Chaperone kann anhand des Vasopressin-Rezeptors V2R näher erläutert werden. Vasopressin, auch Antidiuretisches Hormon (ADH) genannt, wird von der Neurohypophyse zur Regulation des Volumen- und Elektrolythaushalts ausgeschüttet [52]. Ein Mangel dieses Hormons, bzw. ein Defekt des Vasopressin-Rezeptors führt zur Entstehung des sog. Diabetes insipidus. Diese Krankheit ist durch einen Verlust der Fähigkeit Urin zu konzentrieren gekennzeichnet. Dies führt zu Polyurie und Polydipsie [53]. Die renale Form dieser Erkrankung beruht, wie bereits erwähnt, auf einem Defekt des V2-Rezeptors. Dem Funktionsverlust können eine Reihe unterschiedlicher Mutationen zugrunde liegen. Viele dieser Mutationen haben wie zuvor schon die CFTR- Mutation deltaF508 und die ABCA3-Mutation Q215K eine Proteinfehlfaltung zur Folge. Morello et. al. konnten für einige dieser Fälle zeigen, dass spezifische V2R-Antagonisten in der Lage sind, eine korrekte Faltung dieser mutierten Proteine zu unterstützen und somit die Funktionsfähigkeit des Rezeptors wiederherzustellen [54].

Auch im Fall der ABCA3 Mutation Q215K wäre so ein Ansatz denkbar, denn eine Korrektur des Faltungsfehlers würde möglicherweise dazu führen, dass die weitere Prozessierung, und somit die Entstehung der funktionsfähigen 180/150kDa Form von ABCA3, ungestört ablaufen könnte. Ein erster Schritt zur Erreichung dieses Ziels muss hierbei in der Identifikation potentieller pharmakologischer Chaperone für ABCA3 liegen. Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass ABCA3 als ein möglicher Verursacher von "Multidrug Resistenz" in Tumorzellen gilt [55, 56]. So konnten Hirschmann-Jax et al. zeigen, dass ABCA3 in einer Untergruppe der Stammzellen, der sog. "side population" im Vergleich mit anderen Zellen

überexprimiert wird. Diese Art der Stammzellen ist unter anderem dafür bekannt, dass sie antimitotisch wirkende Chemotherapeutika vermehrt aus der Zelle schleusen [56].

Zudem gehen Steinbach et al. davon aus, dass ABCA3 in den Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) ebenfalls als ein Transporter für zahlreiche zytotoxisch wirkende Substanzen fungiert und somit für die Resistenz dieser Zellen gegenüber den genannten Substanzen mitverantwortlich ist [55]. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass bereits andere Proteine aus der ABC-Familie als Transporter für Zytostatika identifiziert werden konnten. Ein Beispiel hierfür ist das P-Glykoprotein, ein Produkt des MDR1-Gens [57]. Es ist also davon auszugehen, dass einige Substanzen, die in der Chemotherapie unterschiedlicher Tumorarten eingesetzt werden, zugleich mögliche Substrate von ABCA3 sind. Diese Tatsache ist für die Suche nach möglichen Chaperonen entscheidend, da im Fall des P-Glykoproteins bereits gezeigt werden konnte, dass einige Chemotherapeutika, wie z.B. Vinblastin als Chaperone fungieren können. Die Inkubation unterschiedlicher Zellreihen mit Vinblastin und anderen Zytostatika führte bei unterschiedlichen Fehlfaltungsmutationen des P-Glykoproteins zur Bildung eines funktionsfähigen Proteins [58].

Zusammenfassend bedeutet dies, dass einige chemotherapeutisch eingesetzte Substanzen, wie Vinblastin, Substrate von ABCA3 sind, und diese Substrate als mögliche Chaperone von ABCA3 fungieren könnten.

Erste Versuche mit Vinblastin und der Fehlfaltungsmutation Q215K erbrachten jedoch nicht die gewünschten Ergebnisse. Auch nach der Behandlung von transient mit Q215K transfizierten HEK293-Zellen mit Vinblastin war im Western Blot weiterhin nur die obere 190kDa große Bande zu detektieren. Dies bedeutet, dass die Fehlfaltung von Q215K mithilfe von Vinblastin nicht korrigiert werden konnte. Die Prozessierung war weiterhin unterbrochen und die N-terminale proteolytische Spaltung von ABCA3 sowie die Bildung des funktionsfähigen Transporters konnten nicht stattfinden.

Es ist möglich, dass ein Grund hierfür der ausgeprägte zytotoxische Effekt der gewählten Vinblastinkonzentrationen auf die HEK293-Zellen war. Weitere Experimente müssen klären, ob gegebenenfalls niedrigere Konzentrationen oder andere Chemotherapeutika in der Lage sind, die Fehlfaltung von ABCA3 zu korrigieren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Fan LL., Langston C., Pediatric interstitial lung disease – Children are not small adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002; 165:1466–1467.
- [2] Clement A., Nathan N., Epaud R., Fauroux B., Corvol H., Interstitial lung diseases in children, *Orphanet J Rare Dis*. 5 (2010);
<https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-5-22>
- [3] Hartl D., Griesse M., Interstitial lung disease in children – genetic background and associated phenotypes, *Respir Res*. 2005; 6(1): 32. doi:
<https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-6-32>
- [4] Renz-Polster H., Krautzig S., *Basislehrbuch Innere Medizin*, 4. Auflage, Elsevier 2008, 498- 501
- [5] Noguee LM., Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease, *Annu Rev Physiol* 66 (2004); 602-623
- [6] Bullard JE, Wert SE, Noguee LM. ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease. *Semin. Perinatol*. 2006; 30:327–334
- [7] Das S, Langston C, Leland LF, Interstitial lung disease in children, *Curr Opin Pediatr* 2011; 23:325-331
- [8] Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, et. al., Pathology Cooperative Group: ChILD Research Co-operative. Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme, *Am J Respir Crit Care Me* 2007; 176:1120-1128
- [9] Reinhardt D, *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter* 7. Auflage, Springer 2004; 1999-2002
- [10] Fan LL, Kozinetz CA, Factors Influencing Survival in Children with Chronic Interstitial Lung Disease, *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156:939-942
- [11] Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Noguee LM, ABCA3 Mutations Associated with Pediatric Interstitial Lung Disease, *Am J Resp Crit Care Med* 2005; 172: 1026-1031
- [12] Noguee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA, A mutation in Surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease, *N Eng J Med* 2001; 344:573-579
- [13] Matsumura Y, Ban N, Inagaki N, Aberrant catalytic cycle and impaired lipid transport into intracellular vesicles in ABCA3 mutants associated with nonfatal pediatric interstitial lung disease, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:698-707

- [14] Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Noguee LM, Langston C, Mallory GB, Sockrider MM, Fan LL, Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children, *Thorax* 2008;63:366-373
- [15] Muntau AC, Intensivkurs Pädiatrie, Elsevier 5. Auflage 2009; 8-9
- [16] Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J, Physiologie, Elsevier 4. Auflage 2005; 495-496
- [17] Cheong N, Zhang H, Madesh M, Zhao M, Dodia C, Fisher AB, Savani RC, Shuman H, ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo, *JBC* 2007;282:23811-23817
- [18] Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, Inagaki N, ABC3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis, *JBC* 2007;282:9628-9634
- [19] Matsumura Y, Sakai H, Sasaki M, Ban N, Inagaki N, ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells, *FEBS Letters* 2007;581:3139-3144
- [20] Matsumura Y, Ban N, Ueda K, Inagaki N, Characterization and Classification of ATP-binding Cassette Transporter ABCA3 Mutants in Fatal Surfactant Deficiency, *The Journal Of Biological Chemistry* 2006;281:34503-34514
- [21] Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, ABCA3 Gene Mutation in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency, *N Eng J Med* 2004; 350:1296-1303
- [22] Nagata K, Yamamoto A, Ban N, Tanaka AR, Matsuo M, Kioka N, Inagaki N, Ueda K, Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles, *BBRC* 2004;324:262-268
- [23] Tanaka AR, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S, Ueda K, Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjögren's Syndrome, *BBRC* 2001; 283:1019-1025
- [24] Cheong N, Madesh M, Gonzales LW, Zhao M, Yu K, Ballard PL, Shuman H, Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrom, *JBC* 2006;281:9791-9800
- [25] Beers MF and Mulugeta S, Surfactant protein C biosyntheses and its emerging role in conformational lung disease, *Annu. Rev. Physiol.* 2005; 67:663-696
- [26] Brasch F, Ochs M, Kahne T, Guttentag S, Schauer-Vukasinovic V, Derrick M, Johnen G, Kapp N, Muller KM, Richter J, Giller T, Hawgood S, Buhling F, Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung, *J Biol Chem.* 2003;278:49006-49014
- [27] Ueno T, Linder S, Na CL, Rice WR, Johansson J, Weaver TE, Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H, *J Biol Chem.* 2004;279:16178-16184

- [28] Gerson KD, Foster CD, Zhang P, Zhang Z, Rosenblatt MM, Guttentag SH, Pepsinogen C proteolytic processing of surfactant protein B, *J Biol Chem.* 2008 Apr;283:10330-10338
- [29] Woischnik M, Bauer A, Aboutaam R, Pamir A, Stanzel F, de Blic J, Griese M, Cathepsin H and napsin A are active in the alveoli and increased in alveolar proteinosis, *Eur Respir J.* 2008;31:1197-1204
- [30] Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller KM, Beers MF, Fehrenbach H, Richter J, Batenburg JJ, Bühling F, Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:659-670
- [31] Noguee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR, A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds, *J Clin Invest.* 1994; 93:1860-1863
- [32] Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Noguee LM, Ballard PL, Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22:380-391
- [33] Noguee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA, A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease, *N Engl J Med.* 2001;344:573-579
- [34] Poterjoy BS, Vibert Y, Sola-Visner M, McGowan J, Visner G, Noguee LM, Neonatal respiratory failure due to a novel mutation in the surfactant protein C gene, *J Perinatol.* 2010; 30:151-153
- [35] Cameron HS, Somaschini M, Carrera P, Hamvas A, Whitsett JA, Wert SE, Deutsch G, Noguee LM, A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease, *J Pediatr.* 2005; 146:370-375
- [36] Nylander S, Kalies I, Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry, *J Immunol Methods.* 1999; 224:69-76
- [37] Mollenhauer HH, Morré DJ, Rowe LD, Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity, *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1031:225-246
- [38] Beers MF, Inhibition of cellular processing of surfactant protein C by drugs affecting intracellular pH gradients, *J Biol Chem.* 1996;271:14361-14370
- [39] Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y, Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells, *J Biol Chem.* 1991;266:17707-17712
- [40] Weaver TE, Na CL, Stahlman M, Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant, *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:263-270

- [41] Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW, ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFVNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities, *J Biol Chem.* 2001;276:15137-15145
- [42] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J Mol Biol.* 2004;340:783-795
- [43] Shen HB, Chou KC, Signal-3L: A 3-layer approach for predicting signal peptides, *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363:297-303
- [44] Ellis RJ, The general concept of molecular chaperones, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1993;339:257-261
- [45] Frydman J, Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones, *Annu Rev Biochem.* 2001; 70:603-647
- [46] Richter K, Haslbeck M, Buchner J, The heat shock response: life on the verge of death, *Mol Cell.* 2010; 40:253-266
- [47] Amaral MD, Therapy through chaperones: sense or antisense? Cystic fibrosis as a model disease, *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:477-487
- [48] Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR, Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation, *J Biol Chem.*;271:635-638
- [49] Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, Guggino SE, Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J Biol Chem.* 2003;278:51232-51242
- [50] Muntau AC, Intensivkurs Pädiatrie, Elsevier 5. Auflage 2009; 323-328
- [51] Qu BH, Strickland E, Thomas PJ, Cystic fibrosis: a disease of altered protein folding, *J Bioenerg Biomembr.* 1997; 29:483-490
- [52] Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J, Physiologie, Elsevier 4. Auflage 2005; 578-580
- [53] Herold G, Innere Medizin, 2008; 736-737
- [54] Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petäjä-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M, Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants, *J Clin Invest.* 2000; 105:887-895
- [55] Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, Gruhn B, Dawczynski K, Bertholet V, de Longueville F, Zintl F, Remacle J, Efferth T, ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia, *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4357-4363

- [56] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK, A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14228-14233
- [57] Loo TW, Clarke DM, Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators, *J Biol Chem*. 1997;272:709-712
- [58] Noguee LM, Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease, *Annu Rev Physiol*. 2004;66:601-623
- [59] Dobbs LG, Pulmonary Surfactant, *Ann. Rev. Med*. 1989;40:431-446
- [60] Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE, Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease, *Annu Rev Med*. 2010;61:105-119
- [61] Haagsman HP, Diemel RV, Surfactant-associated proteins: functions and structural variation, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;129:91-108
- [62] Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL, Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C, *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;5:41-50
- [63] Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA, Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells, *J Appl Physiol*. 1987;63:692-698
- [64] Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S, Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11869-11874
- [65] Mulugeta S, Beers MF, Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung, *Microbes Infect*. 2006; 8:2317-2323
- [66] Rooney SA, Regulation of surfactant secretion, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;129:233-243
- [67] Rooney SA, Phospholipid composition, biosynthesis, and secretion, R.A. Parent (Ed.), *Comparative Biology of the Normal Lung*, CRC Press, Boca Raton 1992: 511–544
- [68] Mulugeta S, Gray JM, Notarfrancesco KL, Gonzales LW, Koval M, Feinstein SI, Ballard PL, Fisher AB, Shuman H, Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3, *J Biol Chem*. 2002;277:22147-22155
- [69] Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N, ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells, *FEBS Lett*. 2001; 508:221-225
- [70] Higgins CF, ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview, *Res Microbiol*. 2001; 152:205-210

- [71] Dean M, Hamon Y, Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *J Lipid Res.* 2001;42:1007-1017
- [72] Albrecht C, Viturro E, The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases, *Pflugers Arch.* 2007;453:581-589
- [73] Yoshida I, Ban N, Inagaki N, Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells, *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004;323:547-555
- [74] Chapuy B, Koch R, Radunski U, Corsham S, Cheong N, Inagaki N, Ban N, Wenzel D, Reinhardt D, Zapf A, Schweyer S, Kosari F, Klapper W, Truemper L, Wulf GG, Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration, *Leukemia* 2008; 22: 1576-1586
- [75] Beers MF, Zhao M, Tomer Y, Russo SJ, Zhang P, Gonzales LW, Guttentag SH, Mulugeta S, Disruption of N-linked glycosylation promotes proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCA3
- [76] Beers MF, Hawkins A, Shuman H, Zhao M, Newitt JL, Maguire JA, Ding W, Mulugeta S, A novel conserved targeting motif found in ABCA transporters mediates trafficking to early post-Golgi compartments, *J Lipid Res* 2011;52: 1471-1482
- [77] Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schroten H, Mildenerberger E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griesse M, Schmitz G, Alteration of the Pulmonary Surfactant System in Full-Term Infants with Hereditary ABCA3 Deficiency, *Am J Res Crit Care Med* 2006; 174: 571-580
- [78] Kaltenborn E, Kern S, Frixel S, Fragnet L, Conzelmann K-K, Zarbock R, Griesse M, Respiratory syncytial virus potentiates ABCA3 mutation-induced loss of lung epithelial cell differentiation, *Human Molecular Genetics* 2012; 21: 2793-2806
- [79] Gregersen N, Protein misfolding disorders: Pathogenesis and intervention, *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 456-470
- [80] Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torrey JM, Wegner DJ, Bennet K, An P, Land G, Saugstad OD, Henderson H, Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency, *Pediatr. Res.* 2008; 63: 645-649
- [81] Jorch G, Hübler A, Neonatologie-Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen, 1.Auflage, Thieme Verlag 2010, S166-175

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	"ATP-binding cassette"- Transporter
ADH	Antidiuretisches Hormon
AML	Akute myeloische Leukämie
ANS	Atemnotsyndrom
BafA	BafilomycinA
BrefA	Brefeldin A
CB	Composite body
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DAPI	4,6'diamidino-2-phenylindole
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GA	Golgi Apparat
GFP	Green fluorescent protein
HA	Human influenza hemagglutinin
HEK	Human embryonic kidney
HSP	Heat Shock Proteins
HRCT	High-resolution computed tomography
IIP	Idiopathische interstitielle Lungenerkrankung
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
kDa	Molekulare Maßeinheit (Kilodalton)
LAMP3	lysosome-associated membrane glycoprotein 3
LB	Lamellarkörperchen
Mon	Monensin Sodium
MVB	Multi vesicular body
NaCl	Natriumchlorid

NBD	Nucleotid-binding Domain
NEHI	Neuroendocrine cell Hyperplasia of infancy
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SP	Surfactant Protein
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TMD	Transmembrane Domain
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Alveole	9
Abbildung 2: Biosynthese und Sekretion von Surfactantfilmbestandteilen.....	12
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung eines ABC-Transporters	20
Abbildung 4: Western Blot mit C-terminal mit HA-markiertem ABCA3-WT	21
Abbildung 5: Bisher bekannte Schritte der ABCA3 Prozessierung.....	24
Abbildung 6: Western Blot mit C-terminal mit HA-markierter ABCA3-Q215K-Mutante	26
Abbildung 7: Western Blot mit C-terminal mit HA-markierter ABCA3-E292V-Mutante	27
Abbildung 8: Kontrolle der Plasmidisolierung mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	37
Abbildung 9: Größenbestimmung des PCR-Produkts mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	39
Abbildung 10: Vergleich zwischen transient und stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC- Plasmid transfizierten Zellen im Western Blot	51
Abbildung 11: Kontrolle des fertigen GFP ^N -ABCA3-WT-Vektors mittels Agarosegel- Elektrophorese.....	52
Abbildung 12: Western Blot mit C-sowie N-terminal markiertem WT-ABCA3	54
Abbildung 13: Auswirkung der Deglykosylierung von WT-ABCA3 im Western Blot	55
Abbildung 14: Schematische Darstellung der ABCA3-Prozessierung und Angriffsorte der verwendeten Antibiotika	56
Abbildung 15: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	57
Abbildung 16: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Monensin und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	58
Abbildung 17: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Bafilomycin A1 und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	59
Abbildung 18: Nachweis des proteolytisch abgespaltenen N-Terminus von WT-ABCA3 in LBs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	61
Abbildung 19: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung	62

Abbildung 20: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-WT-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit E64 (Cysteinproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung	63
Abbildung 21: Immunfluoreszenzmikroskopie von mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Plasmid transfizierten HEK293 Zellen	65
Abbildung 22: Vergleich zwischen transient und stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Plasmid transfizierten Zellen im Western Blot	66
Abbildung 23: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	67
Abbildung 24: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3- E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Monensin und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	67
Abbildung 25: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Bafilomycin A1 und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	68
Abbildung 26: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit E64 (Cysteinproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung	69
Abbildung 27: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-E292V-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor) und Auswirkung auf die Proteinprozessierung	69
Abbildung 28: Immunfluoreszenzmikroskopie von mit dem pub6-hABCA3-Q215K-HAC-Plasmid transfizierten HEK293 Zellen	70
Abbildung 29: Behandlung von stabil mit dem pub6-hABCA3-Q215K-HAC-Vektor transfizierten Zellen mit Brefeldin A und Auswirkung auf die Proteinprozessierung.....	71

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	34
Tabelle 2: Verwendete Primer.....	34
Tabelle 3: Reaktionsansätze DNA-Elektrophorese mit pcDNA3 ABCA3 WT.....	36
Tabelle 4: Reaktionsansätze DNA Elektrophorese mit pEGFP-C1	36
Tabelle 5: Zeitlicher Ablauf PCR.....	38
Tabelle 6: Reaktionsansatz Plasmid DNA- und PCR Produktverdau.....	40
Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Aufreinigung von Plasmid DNA- und PCR Produktverdau ..	40
Tabelle 8: Verwendete Western Blot Antikörper und das jeweilige Zielprotein.....	47
Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur Immunfluoreszenz und jeweilige Zielstrukturen.....	49

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Stefanie Gschwendtner (geb. Engelbrecht)

Klinisch-Praktische Ausbildung

seit 11/2012 **Assistenzarzttätigkeit**

Pädiatrie im Kreisklinikum Altötting

02/2011-01/2012 **Praktisches Jahr**

1. Tertial Allgemeine Chirurgie in der Kinderchirurgischen Klinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

2. Tertial Innere Medizin im Städtischen Klinikum München Neuperlach

3. Tertial Wahlfach Kinderheilkunde in der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Famulaturen

09/2010 Anästhesie am Universitätsklinikum München

03/2010 Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderklinikum, München

08/2008 Pädiatrie in der Praxis von Dr. Michael Osang, München

03/2008 Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Berlin

Studium

10/2005-05/2012

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Staatsexamen (09/2007): Note 1,5

2. Staatsexamen (05/2012): Note 1,0

Gesamtabschlussnote: 1,16

Experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. M. Griesse – Abteilung für Pulmonologie 1

Thema: „Der Surfactantlipidtransporter ABCA3 wird in LAMP3-positiven Vesikeln N-terminal proteolytisch gespalten“

Schulausbildung

1996-2005

Sophie Scholl Gymnasium München

Abiturnote 1,4

2002-2003

Austauschprogramm an der La Grange High School, La Grange (Texas), USA

1992-1996

Grundschule an der Wilhelmstraße, München

Engagement

11/2009-11/2010

Junior Mentor beim Mecum-Mentor Programm der Medizinischen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

03/2009-09/2010

Fellowship beim Förderprogramm für Lehre und Forschung (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

7.5 Publikationsliste

Engelbrecht S., Kaltenborn E., Griesse M., Kern S., The surfactant lipid transporter ABCA3 is N-terminally cleaved inside LAMP3-positive vesicles, FEBS Lett. 2010 Oct 22; 584(20):4306-12. doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.026. Epub 2010 Sep 21

Author information

Pediatric Pneumology, Dr. von Hauner Children's Hospital, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

Abstract

ABCA3 mutations cause fatal surfactant deficiency and interstitial lung disease. ABCA3 protein is a lipid transporter indispensable for surfactant biogenesis and storage in lamellar bodies (LB). The protein folds in endoplasmic reticulum and is glycosylated in Golgi en route to the membrane of mature LB and their precursor multivesicular bodies (MVB). In immunoblots, C-terminally labeled ABCA3 appears as two protein bands of 150 and 190 kDa. Using N- and C-terminal protein tags and hindering ABCA3 processing we show that the 150 kDa protein represents the mature ABCA3 whose N-terminus is cleaved by a cysteine protease inside MVB/LB.

8 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Matthias Griesse für die Überlassung der Arbeit, die fachliche Betreuung und die Geduld bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Meiner unmittelbaren Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Sunčana Kern möchte ich ganz besonders danken – sowohl für die Heranführung an das Thema, die Einführung in die Methodik der experimentellen Arbeit, die Hilfestellung bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente, das Aufmuntern nach fehlgeschlagenen Versuchen als auch für die Unterstützung bei der Erstellung der Publikation und dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der AG Griesse für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und ein stets offenes Ohr danken. Besonders herausheben möchte ich hierbei meinen Mitdoktoranden Dr. med. Tobias Thurm und Dr. rer. nat. Eva Kaltenborn.

Ich danke meinen zwei kleinen Söhnen Felix und Moritz dafür, dass sie so brav waren und mich diese Arbeit in meiner Elternzeit fertigstellen ließen.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann Dominik danken, der mich den ganzen langen Weg der Doktorarbeit begleitet hat und ohne dessen konstante Unterstützung und Motivation ich diese Arbeit nie hätte beenden können. Dominik, manchmal glaube ich du kennst mich besser als ich mich selbst. Dein Insistieren darin, dass ich die Doktorarbeit endlich zu einem Abschluss bringe konnte zwar durchaus anstrengend werden, aber letztendlich hat es zu dem gewünschten Ergebnis geführt. Du hast all die Jahre meine Launen ausgehalten, wenn ich wieder das Vertrauen in mich selbst verloren habe und immer mehr an mich geglaubt als ich es selbst je könnte. Ich bin unglaublich dankbar, dass ich dich an meiner Seite habe.

Meiner Freundin Teresa Schneider möchte ich ebenso wie meiner Schwiegermutter Helga Gschwendtner für das Korrekturlesen dieser Arbeit recht herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Mutter Leo Engelbrecht, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, meinen Traum des Medizinstudiums zu verwirklichen, welches mit dieser Arbeit nun endgültig seinen Abschluss findet.

Eidesstattliche Versicherung

Gschwendtner (geb. Engelbrecht), Stefanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Surfactant-Lipidtransporter ABCA3 wird in LAMP3-positiven Vesikeln N-terminal proteolytisch gespalten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Markt, 08.04.2019

Ort, Datum

Stefanie Gschwendtner

Unterschrift Doktorandin/Doktorand